

**Liefert die genusspezifische Chlamydienserologie  
einen Beitrag zur Diagnose  
der ambulant erworbenen Pneumonie?  
- Ein Vergleich serologischer Methoden -**

**Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae (Dr. med.)**

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Maria Breternitz  
geboren am 31.08.1978 in Sömmerda**

**Mit einer Kindheit voll Liebe...**

Die vorliegende Dissertation widme ich  
meinen Eltern.

**Mit einer Kindheit voll Liebe  
kann man es  
ein ganzes Leben hindurch  
in der großen, kalten Welt aushalten.**

**frei nach Jean Paul**

## VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

<	kleiner als
>	größer als
=	Gleichheitszeichen („gleich“)
+	Additionszeichen („plus“)
a	zu je
x	in Gleichungen Multiplikationszeichen („mal“)
Abb.	Abbildung
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
ATP	Adenosin-Triphosphat
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C.	<i>Chlamydia</i>
CAP	ambulant erworbene Pneumonie (englisch: community acquired pneumonia)
Ch VL Q 70	Bezeichnung eines IgG-Kits von Virion/Serion
CI SER.79	Bezeichnung eines IgM-Konjugates von Virion/Serion
COMC	chlamydialer Außenmembrankomplex (englisch: chlamydial outer membrane complex)
CP	Abkürzung in der Herstellerbezeichnung der Hain Diagnostika GmbH für den verwendeten Test („SeroCP“)
<i>C. pneumoniae</i>	<i>Chlamydia pneumoniae</i>
<i>C. psittaci</i>	<i>Chlamydia psittaci</i>
<i>C. trachomatis</i>	<i>Chlamydia trachomatis</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure (englisch: desoxiribonucleic acid)
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
gr.	griechisch
GTP	Guanosin-Triphosphat
EIA	Enzymimmunoassay
ELISA	Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay
et al.	und Mitarbeiter
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FN	Falschnegative
FP	Falschpositive

HRP - Konjugat	konzentriertes Konjugat mit Meerrettichperoxidase
IF	Immunfluoreszenz
IFA	Immunfluoreszenz-Assay
IgA	Immunglobulin Klasse A (Antikörper)
IgG	Immunglobulin Klasse G (Antikörper)
IgM	Immunglobulin Klasse M (Antikörper)
LPS	Lipopolysaccharid
MIF	Mikroimmunfluoreszenz
µm	Mikrometer
nm	Nanometer
NaOH	Natriumhydroxyd
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung (englisch: phosphate buffered saline)
PL	Bezeichnung im Namen der verwendeten Software von Virion/Serion (SERION <i>easy base</i> 4PL-Software)
quant.	quantitativ
®	registriert; warenrechtlich geschützter Name
Rf	Rheumafaktor (meist Antikörper der Klasse IgM, Autoantikörper)
RNA	Ribonukleinsäure (englisch: ribonucleic acid)
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
s	Abkürzung in der Herstellerbezeichnung der Firma Medac für den verwendeten Test („IgM-sELISA medac“)
S	Bezeichnung einer rRNA-Untereinheit (englisch: subunit), hier 16S und 23S rRNA
SLT	Herstellerbezeichnung des Photometers Rainbow (Salzburger Labor Technologie)
Tab.	Tabelle
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
U/min	Umdrehungen pro Minute
U/ml	Einheiten pro Milliliter (englisch: Units per millilitre)
v. a.	vor allem
WHO	Weltgesundheitsorganisation (englisch: World Health Organisation)
z. B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

# INHALTSVERZEICHNIS

## VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

<b>1. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2. EINLEITUNG .....</b>	<b>3</b>
<b>3. CHARAKTERISIERUNG UND BEDEUTUNG DER CHLAMYDIEN..</b>	<b>5</b>
<b>3.1 <i>CHLAMYDIA PNEUMONIAE</i>.....</b>	<b>8</b>
<b>3.2 <i>CHLAMYDIA TRACHOMATIS</i> .....</b>	<b>13</b>
<b>3.3 <i>CHLAMYDIA PSITTACI</i> .....</b>	<b>15</b>
<b>4. ZIELSTELLUNG DER ARBEIT.....</b>	<b>17</b>
<b>5. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>19</b>
<b>5.1 SERENAUSWAHL UND VORGEHENSWEISE .....</b>	<b>19</b>
<b>5.2 SEROLOGISCHE TESTS .....</b>	<b>21</b>
5.2.1 Mikroimmunfluoreszenz (MIF)-Test .....	21
5.2.1.1 Allgemeines .....	21
5.2.1.2 Materialien und Reagenzien .....	22
5.2.1.3 Zusätzlich benötigte Materialien .....	22
5.2.1.4 Testdurchführung .....	22
5.2.2 „Serion ELISA <i>classic</i> Chlamydia IgA, IgG quant.”-Test.....	24
5.2.2.1 Allgemeines und Prinzip .....	24
5.2.2.2 Materialien und Reagenzien .....	25
5.2.2.3 Zusätzlich benötigte Materialien .....	25
5.2.2.4 Testdurchführung .....	25
5.2.3 „ <i>Chlamydia pneumoniae</i> -IgM-sElisa medac“-Test.....	27
5.2.3.1 Allgemeines und Prinzip .....	27
5.2.3.2 Materialien und Reagenzien .....	27
5.2.3.3 Zusätzlich benötigte Materialien .....	28
5.2.3.4 Testdurchführung .....	28
5.2.4 „Sero CP® IgM“-Test .....	29
5.2.4.1 Allgemeines und Prinzip .....	29
5.2.4.2 Materialien und Reagenzien .....	29
5.2.4.3 Zusätzlich benötigte Materialien .....	29
5.2.4.4 Testdurchführung .....	30
5.2.5 IgM-Konjugat-Testmaterial der Firma Virion/Serion .....	31

<b>5. 3 STATISTIK.....</b>	<b>32</b>
5. 3. 1 Sensitivität .....	32
5. 3. 2 Spezifität.....	32
5. 3. 3 Prädiktive Werte und Konfidenzintervalle .....	33
<b>6. ERGEBNISSE .....</b>	<b>35</b>
<b>6. 1 „SERION ELISA CLASSIC CHLAMYDIA IgA, IgG QUANT.“-TEST.....</b>	<b>35</b>
6. 1. 1 Antikörnernachweis in Seren von Patienten mit Pneumonie .....	35
6. 1. 1. 1 IgG-Antikörper .....	35
6. 1. 1. 2 IgA-Antikörper .....	39
6. 1. 2 Antikörnernachweis in Seren von Patienten mit urogenitalen Infektionen .....	42
6. 1. 2. 1 IgG-Antikörper .....	42
6. 1. 2. 2 IgA-Antikörper .....	45
6. 1. 2. 3 Vergleich mit dem MIF-Test bei der Suche nach Antikörpern gegen <i>C. pneumoniae</i> .....	48
6. 1. 3 Antikörnernachweis in Seren von Blutspendern .....	51
6. 1. 3. 1 IgG-Antikörper .....	51
6. 1. 3. 2 IgA-Antikörper .....	54
6. 1. 4 Zusammenfassung .....	57
<b>6. 2 TESTE ZUM NACHWEIS VON CHLAMYDIA-SPEZIFISCHEM IgM.....</b>	<b>61</b>
6. 2. 1 „Chlamydia pneumoniae-IgM-sELISA medac“-Test .....	61
6. 2. 2 „SeroCP® IgM“-Test .....	64
6. 2. 3 IgM-Testmaterial der Firma Virion/Serion .....	67
6. 2. 4 Zusammenfassung .....	69
<b>7. DISKUSSION .....</b>	<b>72</b>
<b>8. SCHLUSSFOLGERUNGEN .....</b>	<b>86</b>
<b>9. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>87</b>
<b>10. ANHANG .....</b>	<b>102</b>
<b>10. 1 VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN .....</b>	<b>102</b>
<b>10. 2 VERZEICHNIS DER TABELLEN.....</b>	<b>104</b>
<b>10. 3 DANKSAGUNG.....</b>	<b>ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.</b>
<b>10. 4 EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG.....</b>	<b>ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.</b>
<b>10. 5 LEBENSLAUF .....</b>	<b>ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.</b>

## 1. ZUSAMMENFASSUNG

Chlamydien, insbesondere der Spezies *C. pneumoniae*, spielen bei der Entstehung der ambulant erworbenen Pneumonie eine wichtige Rolle. Da der direkte Erregernachweis kompliziert ist, basiert ihre Diagnostik auf dem Antikörpernachweis im Serum. Neben dem „Goldstandard“ der serologischen Diagnostik, dem MIF-Test, ist eine Reihe von Nachweismethoden auf dem Markt, und neue kommen ständig hinzu. Dabei gibt es verschiedene Möglichkeiten des Antikörpernachweises. Bestimmte Tests führen ihn genussspezifisch, andere liefern speziesspezifische Ergebnisse, je nachdem, welches Antigen die Grundlage des Tests bildet.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein genussspezifischer ELISA der Firma Virion/Serion vor der Markteinführung evaluiert werden. Bei der Konzeption war die Überlegung angestellt worden, daß bei Beachtung der klinischen Symptomatik auch mit einem genussspezifischen Test eine Aussage über *C. pneumoniae* getroffen werden kann, weil die hohe Prävalenz dieser Spezies in der Bevölkerung einer wesentlich geringeren Prävalenz der anderen Chlamydienarten gegenübersteht. Für den Testaufbau sind Antigene von *C. psittaci* verwendet worden.

Als Referenzmethode für den Testvergleich diente der MIF-Test, der gereinigte und formalinfixierte Elementarkörperchen, von denen die gattungsspezifischen Antigene entfernt wurden, für die Antikörperdetektion verwendet. Der MIF-Test ist in der Lage, speziesspezifische Antikörper aller Immunglobulinklassen gegen Chlamydien zu erkennen. Für die Evaluierung des Tests von Virion/Serion wurden insgesamt 372 Seren verschiedener Diagnosegruppen auf Antikörper der Klassen IgG, IgA und IgM gegen Chlamydien bzw. gegen *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* untersucht. Die Sensitivitäten und Spezifitäten wurden bestimmt und die prädiktiven Werte berechnet. Außerdem wurden die Ergebnisse auch entsprechend der verschiedenen Titer differenziert.

Im ersten Teil der Arbeit wurden 100 Seren von Patienten mit der Diagnose Pneumonie, 100 Seren von Patienten mit urogenitalen Infektionen und 100 Seren von Blutspendern verwendet. Bei der Bewertung der Ergebnisse zeigte sich, daß der Test von Virion/Serion bei der Suche nach IgG- und IgA-Antikörpern ähnliche Werte erreichte. Die Sensitivität des Tests in allen untersuchten Serengruppen war gering (0% - 42,8%), somit ist seine Empfindlichkeit unzureichend. Die Spezifität des Tests war jeweils relativ hoch (75% - 98,9%), negative Seren wurden meist auch als solche erkannt. Der positive prädiktive Wert war jeweils relativ niedrig (0% - 55,5%), der negative prädiktive Wert vergleichsweise hoch (72% - 100%). Seren mit niedrigen Titern wurden relativ zuverlässig richtig erkannt,

hier stimmten die Ergebnisse meist relativ gut mit den Ergebnissen des MIF-Tests überein. In den höheren Titern bestand nur eine geringe Übereinstimmung mit den Ergebnissen des MIF-Tests. Viele Antikörperträger wurden von dem Test nicht erkannt. Insgesamt erwies sich der genusspezifische Test von Virion/Serion im Vergleich zum speziesspezifischen MIF-Test als unzureichend. Eine Markteinführung wurde nicht empfohlen. Die im Titel der Arbeit gestellte Frage, ob ein genusspezifischer Test einen Beitrag zur Diagnostik der ambulant erworbenen Pneumonie liefert, ist im Falle dieses Tests nur mit „Nein“ zu beantworten, da er keinen ausreichenden Beitrag zur Diagnose zu leisten vermag.

Für den zweiten Teil der Arbeit wurden 72 Seren aus einem Pool von Patienten, die in einer zurückliegenden Untersuchung IgM-Antikörper gegen *C. pneumoniae* gehabt hatten, ausgesucht. Diese wurden außer mit dem MIF-Test als Referenztest mit zwei anderen kommerziellen und speziesspezifischen ELISA-Tests, dem „*Chlamydia pneumoniae*-IgM-ELISA medac“-Test der Firma Medac und dem „SeroCP® IgM“-Test der Firma Hain Diagnostika GmbH, und mit einem nicht kommerziell erhältlichen Konjugat von Virion/Serion auf IgM-Antikörper gegen *C. pneumoniae* bzw. Chlamydien untersucht. Der Test von Medac erreichte einen hohen Sensitivitäts- und Spezifitätswert (100%, 74%). Vor allem ist bei diesem Test hervorzuheben, daß er gerade die antikörpertragenden Seren mit den höheren Titern sicher erkannte. Der Test von Hain Diagnostika GmbH erreichte eine Sensitivität von 81,1% und eine Spezifität von 74%. Im Bereich der mittleren Titer erkannte er nicht alle Seren sicher, aber in den höheren Titern wertete er alle antikörpertragenden Seren richtig. Hier wurde deutlich, daß mit ELISAs, die speziesspezifisch ausgerichtet sind, prinzipiell zufriedenstellende Ergebnisse erzielt werden können. Es ist aber bei diesen Tests notwendig, die Diagnose einer Infektion in wichtigen Fällen mit dem MIF-Test zu kontrollieren. Außerdem ist aus diesen Untersuchungen ersichtlich, wie entscheidend die sorgsame Auswahl der Antigene, die zum Testaufbau verwendet werden, ist.

Als Empfehlung für die Praxis wird geschlußfolgert, daß bei der Entwicklung eines neuen Tests nur Antigene der Spezies verwendet werden sollten, gegen die man Antikörper nachweisen möchte. Antigenauswahl und -präparation sollten der Zielstellung des Tests angepaßt werden. Der Test von Virion/Serion erscheint auch im Hinblick auf die neue und wesentlich stärkere Klassifizierung der Chlamydien in elf statt vier Spezies ungeeignet. Es hat sich gezeigt, daß diese Erregergruppe wesentlich stärker zu differenzieren ist, als bisher angenommen wurde. Wird ein neuer Test entwickelt, muß dieser Tatsache beim Testaufbau und bei der Antigenauswahl Rechnung getragen werden.



## 2. EINLEITUNG

Weltweit führen die Infektionskrankheiten die Todesursachenstatistik vor den Herz-Kreislauf-Erkrankungen und den Tumorerkrankungen an (Fünfstück 1999). In Deutschland stehen Infektionskrankheiten nicht mehr auf dem ersten Platz der Liste der Todesursachen. Sie spielen aber auf dem dritten Platz hinter den Herz-Kreislauf-Erkrankungen und den Malignomen (mit Infektionen wie Pneumonie, Sepsis als häufige Todesursache bei den Malignompatienten) dennoch eine bedeutende Rolle, vor allem bezüglich der Volkswirtschaft. Erreger von Infektionskrankheiten sind Viren, Bakterien, Pilze und Protozoen sowie Helminthen und Arthropoden (Parthier 1995). Ausgehend von der Vielzahl und ihrer weltweiten Verbreitung sowie dem Auftreten der Infektionen in allen Altersstufen der Bevölkerung läßt sich die Bedeutung dieser Erkrankungen leicht ermessen. Die Diagnostik, Therapie, die krankheitsbedingten Arbeitsausfälle sowie die Folgeerkrankungen und deren Behandlung verursachen hohe Kosten.

Zu den Infektionskrankheiten gehören die Infektionen des Respirationstraktes. Hier können von Nase (Rhinitis), Nasennebenhöhlen (Sinusitis) und Rachenraum (Tonsillitis, Pharyngitis) über Kehlkopf, Trachea und Bronchien (Laryngitis, Tracheitis, Bronchitis, Bronchiolitis) bis hin zu den Alveolen (Pneumonie) Infektionen auftreten. Auch ist es möglich, daß es zur Infektion des Interstitiums der Lunge kommt (interstitielle Pneumonie).

95% aller Atemwegsinfektionen können ambulant behandelt werden, aber die restlichen 5%, welche eine stationäre Therapie erfordern, verursachen 70% der Kosten (Pressekonferenz Galaxo-Wellcome 1998). Daher ist es schon allein aus wirtschaftlicher Sicht erforderlich, die ambulanten Infektionen so effektiv zu behandeln, daß weitere Exazerbationen und damit Krankenhauseinweisungen vermieden werden. In der Regel setzt eine effektive Therapie eine zuverlässige Diagnostik voraus, denn die Kenntnis der Erreger ist die Grundlage für eine adäquate antimikrobielle Therapie, auch wenn beispielsweise die diagnostische Methode der Serologie im Falle der Pneumonie nur retrospektiv zum Tragen kommt. Der Erregernachweis ist aber in jedem Falle wünschenswert, wenn der Verdacht auf eine mikrobielle Beteiligung am Krankheitsbild besteht (Reber 1991), und er liefert wichtige Daten zur Epidemiologie.

Infektionen des Respirationstraktes werden hauptsächlich bakteriell sowie durch Viren ausgelöst. Sind Bakterien krankheitsverursachend, so gibt es eine Vielzahl von in Frage kommenden Erregern, zum Beispiel Pneumokokken, Staphylokokken, Streptokokken,

Chlamydien, Mykobakterien, Pseudomonaden, Klebsiellen, Mykoplasmen und Coxiellen. Anhand dieser Auflistung wird schon ersichtlich, wie wichtig für eine effektive bzw. effiziente Therapie eine zuverlässige Diagnostik ist. Aus diesem Grund erfolgt eine ständige Neu- und Weiterentwicklung diagnostischer Methoden.

Auf dem kommerziellen Diagnostik-Markt werden zahlreiche unterschiedliche Testverfahren angeboten. In der Regel bedeutet dies für die Praxis, daß für einzelne Erreger von verschiedenen Firmen Diagnose-Tests erhältlich sind. Diese basieren jedoch oft auf unterschiedlichen Nachweisverfahren (z. B. Kultur, Mikroimmunfluoreszenz oder ELISA-Technik) und bedienen sich verschiedenster Möglichkeiten des Testaufbaus.

Neben allgemein einzuhaltenden Anforderungen an die Tests wie Zuverlässigkeit, Sicherheit, Reproduzierbarkeit, hohe Spezifität und Sensitivität unterscheiden sie sich meist hinsichtlich der Kriterien Praktikabilität, Schnelligkeit, Durchführbarkeit, Nachweiskontrollen und Kostenintensität.

Die angebotene Testpalette befindet sich in ständigem Umbruch, da auf neue diagnostische Anforderungen mit neu entwickelten und eingeführten Tests reagiert werden muß und da die Firmen nach Vervollständigung bestehender Bestimmungslücken in ihren Testprogrammen streben. Bevor ein Test kommerziell angeboten werden kann, lassen die Firmen in der Regel in klinischen Einrichtungen eine Evaluierung durchführen.

In der vorliegenden Arbeit wird ein von der Diagnostikfirma Virion/Serion entwickelter Test zum Nachweis von IgG- und IgA-Antikörpern gegen Chlamydien untersucht und seine Praxistauglichkeit im Vergleich zur Referenzmethode und anderen etablierten Tests überprüft.

### 3. CHARAKTERISIERUNG UND BEDEUTUNG DER CHLAMYDIEN

In den letzten Jahren wurde mehrfach über einen stattfindenden Wandel im Erregerspektrum der ambulant erworbenen Pneumonie berichtet. Es zeigte sich der allgemeine Trend einer relativen Zunahme so genannter atypischer Pneumonieerreger, während gleichzeitig grampositive Mikroorganismen (zum Beispiel *Streptococcus pneumoniae*) als Erreger der Pneumonie zurückgingen (Burkhardt et al. 2003, Cosentini et al. 1996). Zu diesen atypischen bzw. intrazellulär agierenden Bakterien gehören die Chlamydien. Der Begriff Chlamydien leitet sich von *chlamys*, gr. „der Mantel“, ab. *Chlamydia* war bisher als die einzige Gattung der Familie *Chlamydiaceae* betrachtet worden (Marre und Hahn 1999). Diese Gattung umfaßte nach allgemeiner Übereinkunft die vier Spezies *C. pneumoniae*, *C. trachomatis*, *C. psittaci* und *C. pecorum*. 1999 schlugen Everett et al. (Everett et al. 1999) allerdings eine Reklassifizierung der Chlamydien vor, die diese Erregergruppe viel stärker differenziert. Sie führten Analysen von verschiedenen RNA-Abschnitten (16S und 23S rRNA) durch und klassifizierten, basierend auf diesen Untersuchungen, die Ordnung *Chlamydiales* neu. Dabei wird eine Einteilung zur Gruppierung innerhalb der Ordnung vorgeschlagen, welche zwei neue Familien innerhalb der *Chlamydiales* und das Einführen von einer neuen Gattung und fünf neuen Spezies bei der Familie der *Chlamydiaceae* vorsieht. Daraus ergibt sich folgende Einteilung:

Übersicht zwischen alter und neuer taxonomischer Einteilung der Ordnung *Chlamydiales* und der Familie *Chlamydiaceae* (Burkhardt et al. 2003, Bush und Everett 2001, Everett et al. 1999, Reinhold und Sachse 2004):

**Ordnung:** *Chlamydiales*

**Familie I:** *Chlamydiaceae* mit zwei Gattungen (Genera):

• **Gattung** *Chlamydia* mit drei Spezies:

- |                                |   |  |
|--------------------------------|---|--|
| - <i>Chlamydia muridarum</i>   | } | alte Spezies: <i>Chlamydia trachomatis</i> |
| - <i>Chlamydia suis</i>        |   |  |
| - <i>Chlamydia trachomatis</i> |   |  |

• **Gattung** *Chlamydophila* mit sechs Spezies:

- *Chlamydophila abortus*
  - *Chlamydophila caviae*
  - *Chlamydophila felis*
  - *Chlamydophila psittaci*
- } alte Spezies: *Chlamydia psittaci*
- 
- *Chlamydophila pecorum*
  - *Chlamydophila pneumoniae*
- alte Spezies *Chlamydia pecorum*
- alte Spezies *Chlamydia pneumoniae*

**Familie II:** *Simkaniaceae* mit einer Spezies:

*Simkania negevensis*

**Familie III:** *Parachlamydiaceae* mit einer Spezies:

*Parachlamydia acanthamoebae*

**Familie IV:** *Waddliaceae* mit einer Spezies:

*Waddlia chondrophila*

Die Ordnung der *Chlamydiales* besteht somit bei Everett et. al. aus vier Familien, wobei die erste Familie, *Chlamydiaceae*, zwei Gattungen (Genera), *Chlamydia* und *Chlamydophila*, umfaßt, die insgesamt neun Arten (Spezies) beinhalten (Everett et al. 1999).

Die Chlamydien sind intrazelluläre Pathogene. Sie enthalten, wie andere Bakterien auch, DNA, RNA, eine zytoplasmatische Membran und eine Zellwand. Der Aufbau dieser Zellwand entspricht im Aufbau der Wand von gramnegativen Bakterien, jedoch fehlt die Peptidoglykanschicht. Bisher wurde davon ausgegangen, daß den Chlamydien außerdem Enzyme für die Elektronentransportkette sowie für die Synthese von Nukleotiden wie Adenosintriphosphat (ATP) und Guanosintriphosphat (GTP) fehlen, so daß sie auf Wirtszellen angewiesen sind, die ihnen als Nukleotid-Quelle dienen. Sie leben beispielsweise – abhängig von der jeweiligen Spezies – in den Epithelien von Schleimhäuten, Endothelien und glatten Muskelzellen der Gefäße (Freidank 1992). Das Fehlen dieser bestimmten Enzyme erklärt, warum Chlamydien lange Zeit als obligat ATP-abhängige Pathogene (Marre und Hahn 1999), auch „Energieparasiten“ genannt (Miura et al. 2001, Peeling und Brunham 1996), bezeichnet worden sind. Viele Jahre wurde davon ausgegangen, daß sie völlig auf von den Wirtszellen gelieferte Energie angewiesen sind. Diese Sichtweise wurde in den letzten Jahren jedoch zunehmend kritisch bewertet (Iliffe-

Lee und McClarty 1999). Mit dem „*Chlamydia* Genom Projekt“ konnten Gene nachgewiesen werden, die letztendlich für die Generierung von ATP zuständig sind (McClarty 1999, Stephens et al. 1998, Vandahl et al. 2001). Bei den Analysen von Genomsequenzen zeigte es sich, daß verschiedene „energieproduzierende“ Enzyme bzw. Proteine, die in den Energiestoffwechsel involviert sind, vorhanden sein müssen, da entsprechende Genomabschnitte vorliegen. Beispielsweise fand man Gene, die für Atmungskettenenzyme kodieren. Daher wird zunehmend angenommen, daß Chlamydien in der Lage sind, ATP zu synthetisieren (Vandahl et al. 2001). Ebenfalls wurde festgestellt, daß die Elementarkörperchen einen Pool von ATP beinhalten (Tipples und McClarty 1993).

Chlamydien haben einen zweiphasigen Lebenszyklus und liegen in zwei morphologisch und funktionell unterschiedlichen Formen vor: Elementarkörperchen stellen die extrazelluläre, metabolisch inaktive, aber infektiöse Form dar. Sie sind kugelig bis oval und haben einen Durchmesser von zirka 0,3 µm. Die Elementarkörperchen werden nach Anheftung an bestimmte Adhäsine der Wirtszellen in Phagolysosomen aufgenommen, welche der Fusion mit Lysosomen widerstehen, und können sich nach zirka ein bis zwei Stunden in die intrazelluläre Form, die Initial- oder Retikularkörperchen, umwandeln. Diese sind metabolisch aktiv, aber nicht infektiös. Sie haben eine ebenfalls kugelige bis ovale Form und einen Durchmesser von zirka 1 µm. Acht bis zwölf Stunden später beginnen sie sich durch Querteilung zu vermehren. Dadurch entsteht ein in rascher Ausdehnung begriffener Einschluß voller Chlamydien in unterschiedlichen Entwicklungsstadien, der einen Großteil der Wirtszelle ausfüllt. Nach zwei bis drei Tagen kann die befallene Zelle rupturieren und die durch Kondensation entstandenen Elementarkörperchen freisetzen, welche neue Zellen befallen können. Der intrazelluläre Vermehrungszyklus der Chlamydien beträgt zwischen 48 und 72 Stunden (Campbell et al. 2001, Kaiser et al. 1998, Marre und Hahn 1999, Peeling und Brunham 1996, Rockey et al. 2000).

Nachfolgend sollen die drei humanpathogenen Chlamydienarten, die in der Lage sind, beim Menschen eine Pneumonie auszulösen, charakterisiert werden. Dabei ist zu beachten, daß bei der Charakterisierung der bisher geltenden Einteilung der Chlamydien gefolgt wird.

### 3.1 *CHLAMYDIA PNEUMONIAE*

*C. pneumoniae* ist ein Bakterium, welches beim Menschen respiratorische Infektionen hervorruft. Der Mensch galt bislang als das einzige Reservoir von *C. pneumoniae* (Burkhardt et al. 2003). Zunehmend wird aber auch über Vorkommen bei Pferden, Koalas und seit neuestem bei Fröschen, Reptilien und Amphibien berichtet (Berger et al. 1999, Bodetti et al. 2002, Campbell et al. 2001, Hotzel et al. 2001, Reed et al. 2000, Wardrop et al. 1999, Wills et al. 1999). Das Prototyp-Isolat von *C. pneumoniae*, TW-183, wurde 1965 von der Konjunktiva eines taiwanesischen Kindes gewonnen (Grayston und Wang 1999). Das erste Isolat von einem Patienten mit einer akuten respiratorischen Erkrankung, bezeichnet als AR-39, wurde 1983 gewonnen (Grayston et al. 1986). Die Bezeichnung TWAR, welche für die Isolate gewählt wurde, stammt von den Laborbezeichnungen der ersten zwei Isolate (Grayston 1992, Grayston 2000, Marrie et al. 1987). 1989 wurden diese Isolate als eine neue Chlamydienspezies, *C. pneumoniae*, beschrieben (Grayston et al. 1989) und anerkannt. Die intensive wissenschaftliche Auseinandersetzung mit *C. pneumoniae* findet also erst seit etwa zwei Jahrzehnten statt. Da von *C. pneumoniae* bisher nur ein Serovar identifiziert wurde (Wang und Grayston 1993), wird die Bezeichnung TWAR synonym für *C. pneumoniae* verwendet (Campbell et al. 2001, Grayston 1992).

*C. pneumoniae* als humanpathogener Erreger befällt die Epithelien des oberen und unteren Respirationstraktes und verursacht grippeähnliche Infekte ebenso wie Sinusitis, Pharyngitis, Bronchitis sowie atypische Pneumonien (Grayston et al. 1990). Es wird nach heutigem Wissen angenommen, daß die Übertragung des Erregers direkt durch Tröpfcheninfektion von Mensch zu Mensch erfolgt (Dalhoff et al. 2000, Falsey und Walsh 1993). Eine durch asymptomatische Träger übertragene Infektion könnte ebenfalls möglich sein (Grayston 1992). Vielleicht übertragen auch nur einige infizierte Personen den Erreger (Aldous et al. 1992). Die Inkubationszeit der *Chlamydia pneumoniae*-Pneumonie ist länger als bei anderen respiratorischen Erregern und kann vom Kontakt bis zum Ausbruch der Pneumonie vier Wochen betragen (Kuo et al. 1995, Schachter und Stamm 1999, Stephens 1999). Wahrscheinlich liegt die Inkubationszeit bei 7 bis 21 Tagen (Campbell et al. 2001, Peeling und Brunham 1996, Grayston 2000). Die Verbreitung erfolgt also sehr langsam, das Fall-zu-Fall-Intervall beträgt etwa dreißig Tage (Blasi et al. 1998, Freidank 1992).

*C. pneumoniae* als Erreger hat durch sein weltweites Vorkommen eine enorme Bedeutung (Grayston et al. 1989, Grayston et al. 1990, Grayston 1992, Marrie et al. 1987). Vermutlich

ist der Erreger das häufigste nichtvirale intrazelluläre humane Pathogen des Respirationstraktes (Blasi et al. 1998). In den meisten Untersuchungen ist *C. pneumoniae* der dritthäufigste Verursacher von Pneumonien (Grayston 2000).

Die durch *C. pneumoniae* verursachten respiratorischen Infektionen laufen oft asymptomatisch ab und dauern lange. 70 bis 90% bleiben subklinisch oder werden häufig aufgrund ihrer grippeähnlichen Symptomatik verkannt. Durch den oft schwachen oder diffusen symptomatischen Verlauf ist die Entdeckung der *C. pneumoniae*-Infektionen erschwert, so daß sich chronische Krankheitsverläufe mit schwerwiegenden Folgeerkrankungen entwickeln können. Einige Infektionen verursachen schwere Erkrankungsfälle, etwa Pneumonie und Bronchitis, die Bettruhe und strenge Therapie erfordern (Grayston 2000). Obwohl die meisten Infektionen harmlos verlaufen oder asymptomatisch bleiben (Grayston et al. 1993), können sie erhebliche Konsequenzen haben. Beispielsweise sind Todesfälle im Zusammenhang mit Chlamydieninfektionen (Pneumonie) bekannt (Grayston et al. 1990, Grayston 1992).

*C. pneumoniae* zählt weltweit zu den am meisten verbreiteten ätiologischen Agentien von ambulant erworbenen Pneumonien, verantwortlich für zirka 10% der Fälle (Blasi et al. 1993, Daugharty et al. 1997, Hermann et al. 2002, Kuoppa et al. 2002, Saikku 1992, Thom et al. 1994) bzw. verwickelt in 6 bis mehr als 20% der Fälle (Blasi et al. 1998, Verkooyen et al. 1997). Ambulant erworbene Pneumonien repräsentieren ein Hauptproblem hinsichtlich Morbidität und Mortalität. In Deutschland erkrankten pro Jahr mehr als 300000 Menschen an Pneumonie. Fälle mit ambulant erworbener Pneumonie machen zirka 4% aller stationären Aufnahmen aus (Schaberg et al. 1998). Die Mortalitätsraten liegen bei 1 bis 5% bei ambulant behandelten Fällen und bei bis zu 25% unter Patienten, bei welchen Hospitalisierung oder Intensivpflege erforderlich ist (Cosentini et al. 1996). In den Industrieländern ist die Pneumonie die häufigste zum Tode führende Infektionskrankheit und steht in der Todesursachenstatistik an 5. Stelle (Moine et al. 1994).

Da die ätiologische Rolle von *C. pneumoniae* somit nicht begrenzt ist auf milde, „atypische“ pulmonale Infektionen (Dalhoff et al. 2000), ist es besonders wichtig, eine zuverlässige Diagnostik zu verwenden, um eine effektive Therapie durchzuführen zu können. Gegen Atemwegsinfektionen, die durch *C. pneumoniae* verursacht werden, kommen verschiedene Antibiotika in Frage. Es können Makrolide (Clarithromycin, Erythromycin), Azalide (Azithromycin), Ketolide (Telitromycin), Tetracycline (Doxycyclin, Minocyclin) und Fluorochinolone (Gefprofloxacin, Ofloxacin, Ciprofloxacin) eingesetzt werden (Burkhardt 2003, Tuschy und Lorenz 2004). *C. pneumoniae* zeigt sich

restistent gegenüber Penicillinen, Cephalosporinen und Cotrimoxazol (Dalhoff et al. 2000, Schaberg et al. 1998, Stahlmann 1999, Tuschy und Lorenz 2004).

Es wird davon ausgegangen, daß jeder Mensch mindestens einmal in seinem Leben eine Infektion mit *C. pneumoniae* durchmacht (Aldous et al. 1992), wobei in Abständen von 4, 6 und 10 Jahren Epidemien auftreten. Weltweit wird mit einer jährlichen Inzidenz für Infektionen bei 1 bis 2% der Bevölkerung gerechnet, in Deutschland mit 1,5 bis 3 Millionen Fällen pro Jahr. Die Infektionshäufigkeit zeigt einen bimodalen Verlauf: Ein erster flacher Gipfel tritt um das 10. Lebensjahr herum auf, ein zweiter, wesentlich deutlicherer findet sich bei 70 Jahren.

Die Antikörperprävalenzkurven zeigen eine niedrige Prävalenz bei Kindern unter 5 Jahren und rasche Zunahme der Prävalenz bei Kindern bzw. Jugendlichen im Alter von 4 bis 15 Jahren. Im Alter von 20 Jahren zeigen etwa 50% der Personen Antikörper (Campbell et al. 2001, Tuschy und Lorenz 2004). Im Erwachsenenalter nimmt die Prävalenz stetig, aber langsamer zu. Jenseits des 70. Lebensjahres können bei 80 bis 100% aller Männer sowie bei 70 bis 80% aller Frauen Antikörper gegen *C. pneumoniae* nachgewiesen werden (Wang und Grayston 1998). Im Mittel beträgt die Seroprävalenz bei Erwachsenen 60 bis 80% (Dalhoff et al. 2000). Diese hohen Seroprävalenzen legen nahe, daß die meisten Menschen während ihres Lebens infiziert werden und gewöhnlich Reinfektionen auftreten, so daß die meisten Infektionen Erwachsener solcherart sind (die IgG-Antikörper erscheinen dann früher). Dabei findet man diese Reinfektionen mit oder ohne meßbare Antikörper und innerhalb von Monaten oder Jahren nach der ersten Infektion (Aldous et al. 1992).

Infektionen mit *C. pneumoniae* treten ubiquitär auf. Die Prävalenz ist bei Erwachsenen in vielen Regionen der Erde hoch (Lin et al. 2004, Marrie et al. 1987), jedoch variiert sie je nach geographischer Lokalisation: In tropischen, weniger entwickelten Gebieten ist sie höher als in nördlicheren, entwickelteren Ländern (Campbell et al. 2001, Saikku 1992). In den südlicheren Breiten besteht eine mehr oder weniger beständige endemische Situation. Je nördlicher ein Gebiet liegt und je dünner es besiedelt ist, desto mehr ist das Auftreten von Epidemien durch *C. pneumoniae* zu beobachten (Leinonen 1993, Saikku 1992).

Männer werden wahrscheinlich häufiger als Frauen infiziert, denn bei ihnen findet man häufiger Antikörper (Aldous et al. 1992, Marrie et al. 1987).



Der wichtigste Manifestationsort von *C. pneumoniae* ist der Respirationstrakt. Neben den oben erwähnten Krankheitsbildern wird *C. pneumoniae* auch mit anderen akuten und chronischen Erkrankungen in Verbindung gebracht (Campbell et al. 2001): Eine Mitbeteiligung an der Pathogenese des Asthma bronchiale wird genauso diskutiert wie die Mitbeteiligung an Otitis media, obstruktiver Lungenerkrankung und pulmonalen Exazerbationen der Zystischen Fibrose (Everett et al. 1999).

In der Literatur wird seit einiger Zeit ein Zusammenhang zwischen *C. pneumoniae* und Koronararterienerkrankung bzw. Arteriosklerose vermutet (Boman et al. 1997, Dugan et al. 2002, Grayston 2000, Kuo et al. 1995, Kuo et al. 1995, Kuo und Campbell 1998). Saikku et al. (Saikku et al. 1988) zeigten, daß Personen mit Koronararterienerkrankung häufiger Antikörper gegen *C. pneumoniae* aufwiesen als Kontrollpersonen. Sie vermuteten erstmals, daß eine Assoziation zwischen *C. pneumoniae* und Arteriosklerose bestehen könnte. Diese auf seroepidemiologischen Ergebnissen basierende Vermutung wurde und wird wiederholt in verschiedenen Untersuchungen und Studien überprüft, z. B. von Grayston und Linnanmaki et al. (Grayston 2000, Linnanmaki et al. 1993). Zusammengefaßt ergaben diese Studien ausreichende Hinweise darauf, daß die vermutete Assoziation besteht und daß Infektionen mit *C. pneumoniae* eine kausale Rolle für die Entstehung der Arteriosklerose spielen (Campbell und Kuo 2003, Campbell und Kuo 2004, Grayston 2000, Kalayoglu et al. 2002, Paz et al. 1998). Obwohl aber vieles auf den Zusammenhang zwischen *C. pneumoniae* und Arteriosklerose hindeutet, konnte der präzise Mechanismus, wie die Entstehung der Arteriosklerose bzw. die Erkrankung selbst beeinflusst wird, bisher nicht geklärt werden (Danesh et al. 1997, Dugan et al. 2002, Grayston und Campbell 1999).

Die Infektionen mit *C. pneumoniae* zeigen eine Neigung zur Entwicklung immunpathologischer Syndrome, wozu unter anderem das Erythema nodosum, Arthralgien und Myalgien, das Löfgren-Syndrom sowie das Guillain-Barre'-Syndrom gehören (Dalhoff et al. 2000).

Außerdem schreibt man *C. pneumoniae* eine ursächliche Beteiligung an zahlreichen anderen Erkrankungen und krankhaften Veränderungen zu bzw. diskutiert diese Beteiligung. Beispielsweise können Endokard und Myokard sowie Perikard bei Chlamydieninfektionen mit betroffen sein (Essig et al. 1993, Grayston 1992, Odeh und Oliven 1992). Auch mit der Sarkoidose (Everett et al. 1999), Thyreoiditis und Enzephalitis (Blasi et al. 1998) und der Multiplen Sklerose (Sriram et al. 1998) wird *C. pneumoniae* in Verbindung gebracht. Darüber hinaus wird über eine nicht unwichtige Rolle des Erregers

in der Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung diskutiert (Balin und Appelt 2001, Stephenson 1999, Yucesan und Sririam 2001). Es ist jedoch noch nicht geklärt, ob *C. pneumoniae* bei diesen Erkrankungen als Verursacher, triggernder Kofaktor oder unbeteiligter Begleitfaktor auftritt, so daß die Rolle des Erregers diesbezüglich in der Literatur bislang kontrovers diskutiert wird (Kutlin et al. 2001) und noch offene Fragen der weiteren Klärung bedürfen (Woessner und Treib 2001).

### 3. 2 *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*

Dieser Erreger wird in unterschiedliche Serotypen unterteilt.

Klassische humane Infektionen mit *C. trachomatis*, hervorgerufen durch die humanpathogenen Serotypen A - C, sind verantwortlich für das Trachom, eine Entzündung der Augenbindehaut, die weltweit die häufigste Ursache für Erblindung ist. Die Übertragung des Erregers erfolgt durch Schmierinfektion. Weltweit sind zirka 500 Millionen Menschen am Trachom erkrankt (Marre und Hahn 1999).

Die Serotypen D - K sind ebenfalls humanpathogen. Die Übertragung erfolgt sexuell bzw. durch Schmierinfektion. Beim Durchtritt durch den Geburtskanal werden Neugeborene infiziert. Diese Serotypen besitzen eine große Bedeutung als Erreger unspezifischer urogenitaler Infektionen, beispielsweise Urethritis und Zervizitis, sowie beim Neugeborenen als Auslöser von Konjunktivitis und Pneumonie. Genitale Chlamydieninfektionen zählen zu den häufigsten sexuell übertragenen Infektionen, beim Mann werden zum Beispiel zirka 50% aller nicht-gonorrhoischen Urethritiden durch den Erreger verursacht (Marre und Hahn 1999). Es wird geschätzt, daß *C. trachomatis* weltweit jährlich 89 Millionen neue Fälle sexuell übertragener Infektionen auslöst (Campbell 2001), in Europa etwa drei Millionen (Peeling und Brunham 1996).

Nach einer Inkubationszeit von zwei bis sechs Wochen entwickelt sich beim Mann eine akut bis chronisch verlaufende Urethritis. Bei Frauen verlaufen die Infektionen in 50 bis 70% der Fälle subklinisch (Peeling und Brunham 1996), so daß ausgehend von einer Urethritis eine aufsteigende Zervizitis und Salpingitis möglich ist. Salpingitiden durch *C. trachomatis* sind wegen der starken Tendenz zur Narbenbildung eine häufige Ursache erworbener Sterilität.

Pneumonien durch *C. trachomatis* kommen meist nur bei Kindern mit einem Alter unter 6 Monaten vor. Die Übertragung des Erregers von der Mutter auf das Kind erfolgt während der Geburt bei Passage der Endozervix. Es wurde aber auch die Möglichkeit der intrauterinen Infektion in den späteren Monaten der Schwangerschaft beschrieben (Numazaki und Niida 2000, Numazaki et al. 2003). Die beim Neugeborenen auftretenden interstitiellen Pneumonien verlaufen bei reifen Kindern verhältnismäßig gutartig, zeigen milde Symptome und haben eine gute Prognose (van der Lely et al. 1993). Frühgeborene sind jedoch stark gefährdet. Die Neugeborenenkonjunktivitis nimmt in der Regel einen gutartigen Verlauf.

Die Serotypen L1 - L3 verursachen das meldepflichtige Lymphogranuloma venereum oder inguinale, welches sexuell übertragen wird. Die Erkrankung ist in Mitteleuropa selten, in Asien und Afrika jedoch häufig (Marre und Hahn 1999).

Man therapiert Infektionen durch *C. trachomatis* mit Azithromycin oder Doxycyclin (Peeling und Brunham 1996).

### 3. 3 *CHLAMYDIA PSITTACI*

*Chlamydia psittaci* hat unter den zoonotischen Chlamydienspezies für die menschliche Lunge die größte Bedeutung (Dalhoff 2004). Es ist ein Erreger, der von Vögeln auf den Menschen übertragen werden kann. Die Inkubationszeit beträgt 5 bis 14 Tage (Johnston et al. 2000). Beim Menschen wird die resultierende Infektion als Psittakose (Übertragung durch Papageienvögel) oder Ornithose (Übertragung durch andere Vögel) bezeichnet. Die Psittakose präsentiert sich klinisch typischerweise als mittelschwere bis schwere Pneumonie mit überwiegend interstitiellen Infiltraten (Dalhoff 2004). Die Schwere der Erkrankung reicht vom inapparenten Verlauf bzw. grippeähnlichen Symptomen bis zur systemischen Krankheit mit schwerer Pneumonie. Sie beginnt häufig plötzlich mit hohem Fieber und Schüttelfrost. Weitere Beschwerden sind Kopfschmerzen, abdominelle Beschwerden, Myalgien und Lichtscheu sowie trockener Husten (Burkhardt et al. 2003). *C. psittaci* kann neben dem Respirationstrakt auch andere Organsysteme befallen und zu Endokarditis, Myokarditis, Perikarditis, Hepatitis, Arthritis, Keratokonjunktivitis und Enzephalitis führen (Burkhardt et al. 2003, Johnston et al. 2000). Die extrapulmonalen Manifestationen in Leber, Milz, Gelenken und ZNS werden häufig beschrieben (Dalhoff 2004). Schwere Erkrankungen mit Ateminsuffizienz, Thrombozytopenie, Hepatitis und Tod des Fetus traten bei schwangeren Frauen auf (Johnston et al. 2000).

Die epidemiologische Bedeutung des Erregers scheint derzeit gering zu sein (Dalhoff 2004). In Deutschland werden gegenwärtig jährlich zirka 100 Erkrankungsfälle beim Menschen registriert (Burkhardt et al. 2003, Weber 2004). In der Regel liegen Einzelerkrankungen vor. Betroffen sind häufig Personal von Geflügelfarmen, Vogelhandlungen oder Geflügelschlachtungen sowie Tierärzte. In den USA schätzt man, daß Pneumonien durch *C. psittaci* beim Menschen etwa 2000-mal seltener sind als Pneumonien durch *C. pneumoniae* (Dalhoff 2004).

Eine Infektion mit *C. psittaci* tritt üblicherweise dann auf, wenn eine exponierte Person den Organismus inhaliert (aerogene Übertragung). Der Erreger befindet sich dabei in kleinen Aerosoltropfen, die Bestandteile von Fäkalien der infizierten Vögel enthalten, oder in respiratorischen Sekreten dieser Vögel. Die Übertragung wird durch engen Kontakt erleichtert, beispielsweise ist auch über Mund-zu-Schnabel-Kontakt eine Erregerübertragung möglich (Johnston et al. 2000, Marre et al. 1999).

Aviäre Stämme von *C. psittaci* können ebenfalls Menschen infizieren (sind humanpathogen). Die Symptome zeigen sich meistens unspezifisch und grippeähnlich, jedoch sind auch schwere Pneumonien, Endokarditis und Enzephalitis bekannt (Sachse und

Grossmann 2002). Kontakte mit infizierten Säugern können beim Menschen außer zu Pneumonie auch zu Arthritis und bei schwangeren Frauen, die mit infiziertem Vieh in Kontakt waren, zu Aborten führen (Bergström et al. 1996). Der enzoonotische Schafabort, der durch bestimmte Stämme von *C. psittaci* hervorgerufen wird, ist als Infektionsquelle für den Menschen gut dokumentiert. Diese potentiell lebensbedrohliche Zoonose tritt bei schwangeren Frauen nach Kontakt mit lammenden Mutterschafen und -ziegen auf und führt während der Schwangerschaft zu schweren fiebrigen Erkrankungen bis zum Abort (Reinhardt und Sachse 2004).

Erkrankungen durch Chlamydienstämme, die bisher als Subtypen von *C. psittaci* betrachtet wurden, verursachen Chlamydiosen außer bei Schafen und Ziegen auch bei Rindern, Schweinen, Katzen und Pferden. Es treten verschiedenste Erkrankungen, unter anderem chronische Infektionen des Reproduktionstraktes, Plazentainsuffizienz und Aborte bei den infizierten Tieren auf (Johnston et al. 2000, Reinhardt und Sachse 2004). Über das mögliche anthroozoonotische Potential dieser Chlamydienstämme ist aber insgesamt nur wenig bekannt. Beispielsweise traten bei Personen, die mit infizierten Katzen zusammen lebten, Konjunktividen und seltener auch atypische Pneumonien auf (Reinhardt und Sachse 2004).

Von *C. psittaci* verursachte Infektionen werden mit Tetrazyklinen oder alternativ mit Makroliden (Erythromycin) therapiert (Dalhoff 2004, Johnston et al. 2000, Peeling und Brunham 1996).

## 4. ZIELSTELLUNG DER ARBEIT

Das Institut Virion/Serion aus Deutschland, das zu einer Reihe von Anbietern von Testverfahren für Chlamydiendiagnostik auf dem kommerziellen Sektor zählt, verfügt über Nachweisverfahren für Antikörper gegen Erreger respiratorischer Infektionen. Ihnen sollte ein Chlamydien-ELISA zum Nachweis von Chlamydien-Antikörpern hinzugefügt werden, um das Firmenangebot an Testverfahren zu vervollständigen und die Testpalette abzurunden. Hierbei handelt es sich um einen ELISA, der Antikörper vom IgG- und IgA-Typ gegen Chlamydien nachweisen soll und dessen geplantes Einsatzgebiet im Bereich der Diagnostik von respiratorischen Infektionen (v. a. ambulant erworbene Pneumonie) liegen soll. Die Schwierigkeit des Tests besteht darin, daß der Antikörpernachweis nicht spezies-, sondern nur genuspezifisch geführt werden kann.

Die Überlegung, mit einem genuspezifischen Test für Antikörper gegen Chlamydien Aussagen zum Vorliegen einer Infektion durch *C. pneumoniae* treffen zu können, beruht auf der Tatsache, daß die Inzidenz bzw. Prävalenz von *C. pneumoniae* wesentlich höher als die der anderen Chlamydienspezies ist. Damit geht es um die Frage, ob unter diesen Voraussetzungen – genuspezifischer Testaufbau zum Nachweis von Antikörpern gegen einen Erreger, der mehrere Spezies ausbildet – eine sichere Diagnostik überhaupt möglich sein kann und ob die Markteinführung eines solchen Tests unter diesen Voraussetzungen denn auch sinnvoll ist. Die Grundfrage bei der Untersuchung dieses Tests ist, ob bei der hohen Prävalenz von Antikörpern gegen *C. pneumoniae* diese auch mit einem genuspezifischen Test erfaßt werden können und ob der Antikörpertest von Virion/Serion zur Diagnose von respiratorischen Infektionen durch *C. pneumoniae* geeignet und einsetzbar ist.

Dies ist besonders mit Blick auf die neueren Erkenntnisse zur Chlamydien-Artenvielfalt und -differenziertheit nötig, denn diese scheint größer zu sein, als lange Zeit angenommen wurde.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll nun geprüft werden, ob sich der neue Test für einen Einsatz in der klinischen Praxis, in diesem Falle zur Diagnose der ambulant erworbenen Pneumonie, als geeignet oder nicht geeignet erweist. Es soll beurteilt werden, ob der neue Test eine ausreichende Sicherheit und Zuverlässigkeit in der Diagnostik von respiratorischen Infektionen, die durch *C. pneumoniae* hervorgerufen wurden, erreicht. Außerdem geht es um seine Standardisierbarkeit, Reproduzierbarkeit, um die Objektivität bei der Ergebnisablesung, die Schnelligkeit des Tests und seine Praktikabilität bzw.

Handhabung. Dies erfolgt im ersten Teil der Arbeit durch Vergleich des Tests von Virion/Serion mit dem MIF-Test als etablierter Referenzmethode.

Ergänzend zum IgG- und IgA-Antikörpernachweis im ersten Teil der Arbeit geht es im zweiten Teil um die Bestimmung von IgM-Antikörpern gegen *C. pneumoniae*. Dabei wurden zwei kommerziell verfügbare, speziesspezifische ELISA-Verfahren der Firmen Medac und Hain Diagnostika GmbH sowie ein nicht kommerziell verfügbares Konjugat der Firma Virion/Serion (ELISA-Technik) mit den Ergebnissen des MIF-Tests als Referenzverfahren verglichen. Anschließend werden die Ergebnisse bewertet und Schlußfolgerungen für die Praxis gezogen.



## 5. MATERIAL UND METHODEN

### 5.1 SERENAUSWAHL UND VORGEHENSWEISE

Alle verwendeten Seren wurden im Institut für Medizinische Mikrobiologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena aufbewahrt. Sie waren bei  $-30^{\circ}\text{C}$  eingefroren und wurden bei Bedarf entnommen und aufgetaut.

Aus einem vorhandenen Pool von Seren des Institutes wurden 300 Seren ausgewählt, die sich in 3 (Diagnose-)Gruppen mit jeweils 100 Seren einteilen ließen. Es wurde in den 300 Seren mit dem MIF-Test als Standard- oder Referenzmethode nach IgA- und IgG-Antikörpern gegen *C. pneumoniae* bzw. *C. trachomatis* bei verschiedenen Titern gesucht. Mit dem ELISA von Virion/Serion als zu evaluierender Methode wurde in diesen Seren nach IgA- und IgG-Antikörpern gegen Chlamydien gesucht. Die Ergebnisse beider Bestimmungen wurden dann miteinander verglichen, wobei der MIF-Test die „Sollwerte“ lieferte.

Die erste Gruppe von Seren stammte von Patienten mit der Diagnose Pneumonie oder atypische Pneumonie. Sie umfaßte 62 Seren von männlichen und 38 von weiblichen Patienten im Alter von 1 bis 93 Jahren mit einem Altersdurchschnitt von 52 Jahren.

Die zweite Gruppe Seren war von Patienten mit der Diagnose einer urogenitalen Infektion gewonnen worden, zum Beispiel mit Urethritis oder Zervizitis. Hier wurden Seren von 16 männlichen und 84 weiblichen Erkrankten im Alter von 1 bis 45 Jahren mit einem Altersdurchschnitt von 23 Jahren untersucht.

Die dritte Gruppe bildeten Seren von Blutspendern, die ohne bekannte Erkrankungen waren. Hier wurden die Seren von 73 männlichen und 27 weiblichen Spendern im Alter von 20 bis 64 Jahren mit einem Durchschnittsalter von 34 Jahren in die Untersuchungen einbezogen.

Im zweiten Teil der Arbeit ging es um den Nachweis von IgM-Antikörpern gegen *C. pneumoniae*. Hierfür wurden 72 Seren ausgewählt. Sie stammten von 37 männlichen und 35 weiblichen Personen im Alter von 3 bis 79 Jahren mit einem Altersdurchschnitt von 38 Jahren, die in einem früher durchgeführten MIF-Test IgM-positiv für *C. pneumoniae* waren. Der Pool enthielt nur diese begrenzte Anzahl von Seren mit dieser Eigenschaft. Die Antikörperbestimmung erfolgte zuerst mit der Referenzmethode, dem MIF-Test, und dann mit Tests der Firmen Medac und Hain Diagnostika GmbH sowie einem Konjugat von

Virion/Serion. Die Ergebnisse der drei Tests wurden mit den Ergebnissen des MIF-Tests verglichen.

Zur Bestimmung von Antikörpern der Klassen IgA, IgG und IgM gegen Chlamydien bzw. gegen *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* wurden insgesamt folgende serologische Tests einbezogen und durchgeführt:

1. Mikroimmunfluoreszenz (MIF)-Test in „inhouse“-Technik des Instituts für Medizinische Mikrobiologie
2. „Serion ELISA classic *Chlamydia* IgA, IgG/quant.“-Test der Firma Virion/Serion
3. „*Chlamydia pneumoniae*-IgM-sELISA medac“-Test der Firma Medac
4. „SeroCP<sup>®</sup> IgM“-Test der Firma Hain Diagnostika GmbH.

Außerdem wurde mit IgM-Testmaterial der Firma Virion/Serion gearbeitet.

## 5. 2 SEROLOGISCHE TESTS

### 5. 2. 1 Mikroimmunfluoreszenz (MIF)-Test

#### 5. 2. 1. 1 Allgemeines

Diese Methode gilt als „Goldstandard“ in der Chlamydienserologie (Hermann et al. 2002, Peeling und Brunham 1996). In dieser Arbeit dient sie als Referenzmethode, mit welcher der neue Test von Virion/Serion, die Tests von Medac und Hain Diagnostika GmbH sowie das IgM-Konjugat von Virion/Serion verglichen werden.

Beim MIF-Test handelt es sich um ein von Wang und Grayston (Wang und Grayston 1970) entwickeltes serologisches Verfahren zum Nachweis von Antikörpern gegen Chlamydien. Es werden formalinfixierte Elementarkörperchen der jeweiligen Chlamydienarten als Antigen verwendet (Wang 2000). So sind Antikörper gegen die einzelnen Arten (Spezies) serologisch differenzierbar. Speziesspezifische Antikörper der Immunglobulinklassen IgG, IgA und IgM können bislang am besten und mit der höchsten Spezifität mit dieser Methode nachgewiesen werden.

Bei einer Erstinfektion sind spezifische Antikörper der IgM-Klasse etwa zwei bis drei Wochen nach Krankheitsbeginn nachweisbar. Nach zwei bis drei Monaten findet man keine IgM-Antikörper mehr. Spezifische Antikörper der Klasse IgG findet man erst etwa 6 bis 8 Wochen nach Krankheitsbeginn (Dowell et al. 2001, Grayston et al. 1990, Marrie et al. 1987).

Hat eine Reinfektion stattgefunden, sind positive IgM-Antikörper oft nicht nachweisbar, spezifische IgG-Antikörper jedoch können ein bis zwei Wochen nach dem Krankheitsbeginn auftreten und dann hohe Titer erreichen (Dowell et al. 2001, Freidank 1992). Für eine akute *C. pneumoniae*-Infektion sprechen im MIF-Test ein IgM-Antikörpertiter > 1:16, ein vierfacher Titeranstieg im IgG oder ein IgG-Antikörpertiter > 1:512 (Grayston et al. 1990). Außerdem ist nach Ekman et al. (Ekman et al. 1993) ein vierfacher Titeranstieg im IgA oder ein IgA-Titer > 1:512 als positiv zu werten. Wichtig ist, daß die Durchführung des MIF-Tests und insbesondere die Ablesung der Ergebnisse entsprechende Erfahrung voraussetzen (Oehme 1999).

Im Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universität Jena wird ein hauseigener MIF-Test durchgeführt. Für die Bewertung gelten hier folgende Normwerte:

IgG < 1:128 = negativ

IgM < 1:40 = negativ

IgA < 1:80 = negativ.

#### **5. 2. 1. 2 Materialien und Reagenzien**

- Virotech Gullsorb Human IgG Inactivation Reagent
- Bios Konjugat anti-IgG FITC markiert
- Bios Konjugat anti-IgA FITC markiert
- Bios Konjugat anti-IgM FITC markiert
- Biopharm Riad Fluor Eindeckmedium
- Merck Immersionsöl
- PBS (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
- Aqua bidest.

#### **5. 2. 1. 3 Zusätzlich benötigte Materialien**

- mit Antigen beschichtete Objektträger, hausintern hergestellt
- Bio Merieux *Chlamydia psittaci*-Spot IF
- Deckgläschen
- Mikrotiterplatten
- Eppendorf-Tubes
- Eppendorf-Pipetten
- feuchte Kammer
- Küvetten
- Eppendorf-Zentrifuge

#### **5. 2. 1. 4 Testdurchführung**

Im Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universität Jena wird der MIF-Test in der hier beschriebenen Art und Weise durchgeführt (Institut für Medizinische Mikrobiologie 2001).

Für die Suche nach Antikörpern der Klasse IgG wird folgendermaßen vorgegangen: Zuerst wird in einer Mikrotiterplatte eine Verdünnungsreihe hergestellt (1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512). Die Mikrotiterplatte wird entsprechend den Patientennummern beschriftet.

In die ersten Vertiefungen werden 75 µl PBS, in die nächsten fünf Vertiefungen 25 µl PBS vorgelegt. Dann werden zu den 75 µl PBS je 5µl Serum hinzupipettiert, was eine Verdünnung von 1:16 ergibt. Nach dem Mischen mit der Mehrkanalpipette werden jeweils 25 µl in die nächste Vertiefung überpipettiert. Dies wird bis zur Verdünnung 1:512 fortgesetzt.

Die antigenbeschichteten Objektträger werden beschriftet. Danach trägt man jeweils 10µl der Serumverdünnungen auf die Antigenfelder der Objektträger auf (1:16 bis 1:512). Bei 37°C wird anschließend eine Stunde in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach spült man zweimal 10 Minuten in Küvetten mit PBS. Jetzt werden die Objektträger kurz in Aqua bidest. getaucht und zum Trocknen aufgestellt. Auf jedes Antigenfeld wird ein Tropfen FITC-markiertes Antihuman-IgG-Konjugat gegeben und anschließend bei 37°C für 30 Minuten in der feuchten Kammer erneut inkubiert. Es folgen danach wieder zweimal 10 Minuten Spülen in PBS, Abspülen in Aqua bidest. und Trocknen. Die Antigenfelder werden mit Eindeckmedium bedeckt und es wird ein Deckglas aufgelegt. Mikroskopiert wird mit Ölimmersion in 1000facher Vergrößerung.

Zur Bestimmung der Antikörpertiter der Klassen IgA oder IgM werden die Patientenseren mit einem Absorbens, das die eventuell vorliegenden unspezifischen IgM-Antikörper (Rheumafaktoren, Autoantikörper, gerichtet gegen IgG) entfernt, vorbehandelt. Die Rheumafaktoren könnten andernfalls falschpositive IgM-Titer verursachen, daher ist die Absorption vor der Bestimmung unerlässlich (Verkooyen et al. 1992). Es wird in Eppendorf-Tubes 5 µl Patientenserum mit 20 µl PBS und 25 µl Gullisorb (anti-human IgG-Antikörper-Reagenz) gemischt, 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und danach 10 Minuten bei 14000 U/min zentrifugiert. Ausgehend von dieser Verdünnung des Serums wird in der Mikrotiterplatte eine Verdünnungsreihe von 1:20, 1:40, 1:80 hergestellt. In die ersten drei Vertiefungen werden 25 µl PBS vorgelegt. In die erste Vertiefung pipettiert man 25 µl klaren Überstand aus den Eppendorf-Tubes dazu. Mit einer Mehrkanalpipette mischt man und pipettiert 25 µl bis zur Verdünnung 1:80 über. Nach Beschriftung der antigenbeschichteten Objektträger werden jeweils 10 µl der Serumverdünnung aufgetragen, für IgA bis 1:80, für IgM bis 1:40 der Verdünnung. Nun wird bei 37°C in der feuchten Kammer eine Stunde inkubiert und dann zweimal 10 Minuten in den Küvetten mit PBS gespült. Nach dem kurzen Eintauchen in die Küvette mit Aqua bidest. stellt man die Objektträger zum Trocknen auf und tupft sie anschließend mit Tüchern vorsichtig ab. Auf jede Vertiefung wird ein Tropfen Konjugat anti-IgA oder -IgM gegeben und danach

bei 37°C für 30 Minuten in der feuchten Kammer inkubiert. Jetzt wird erneut zweimal 10 Minuten in den Küvetten mit PBS gespült, dann kurz in Aqua bidest. getaucht, der Objektträger zum Trocknen aufgestellt und anschließend mit Tüchern vorsichtig abgetupft. Je ein Tropfen Eindeckmedium wird auf die Objektträger gegeben, ein Deckgläschen aufgelegt und mit Immersionsöl beschichtet, so daß nun bei tausendfacher Vergrößerung mikroskopiert werden kann.

## **5. 2. 2 “Serion ELISA *classic* Chlamydia IgA, IgG quant.”-Test**

### **5. 2. 2. 1 Allgemeines und Prinzip**

Bei dem „Serion ELISA *classic* Chlamydia IgA, IgG quant.“-Test von Virion/Serion (Virion/Serion 2001) handelt es sich um das Verfahren, welches im Rahmen dieser Arbeit mit dem MIF-Test verglichen wurde, um es hinsichtlich seiner Treffsicherheit, Objektivität und Einsatzfähigkeit in Routinelabors zu bewerten. Der Test wurde vom Anbieter neu entwickelt und sollte auf seine Eignung zur Erfassung respiratorischer Infektionen, insbesondere der ambulant erworbenen Pneumonie, überprüft werden.

Der vorliegende Test beruht auf dem Prinzip der ELISA-Technik. Es werden Mikroteststreifen verwendet, deren Kavitäten mit einem entsprechenden Antigen beschichtet sind. In diesem Test wurden Elementarkörperchen von *C. psittaci* als Antigen verwendet. Liegen im Serum des Patienten entsprechende Antikörper gegen Chlamydien vor, so binden sie an die in der Platte fixierten Antigene. Diese serologische Reaktion soll sichtbar gemacht werden. Aus dem Grund setzt man Nachweisantikörper ein, welche mit alkalischer Phosphatase markiert sind. Die so markierten Antikörper sind gegen die humanen Antikörper gerichtet, die sich bei Vorhandensein an das Antigen in der Platte gebunden haben. Anschließend wird ein Substrat für das Enzym zugesetzt, hierbei handelt es sich um para-Nitrophenylphosphat. Es findet eine Enzym-Substrat-Reaktion statt, wenn im Patientenmaterial Antikörper vorhanden waren, an die sich die markierten Antikörper binden konnten. Der Substratumsatz führt zu einem gelb gefärbten Endprodukt. Die Intensität der Gelbfärbung kann photometrisch ermittelt werden. Sie ist dem Gehalt an spezifischen Antikörpern proportional.

#### **5. 2. 2. 2 Materialien und Reagenzien**

Testkit enthält:

- Antigen-Teststreifen a 8 Kavitäten, Flachboden
- Standardserum, gefärbt und gebrauchsfertig
- Kontrollserum negativ, gefärbt und gebrauchsfertig
- Anti-Human-IgG- oder -IgA-Konjugat
- Waschlösungskonzentrat, ausreichend für 1 Liter
- Verdünnungspuffer für Sera und Konjugat, mit Proteinzusatz, gefärbt und gebrauchsfertig
- Substratpuffer
- Substrat-Tabletten
- Stopplösung (NaOH)

#### **5. 2. 2. 3 Zusätzlich benötigte Materialien**

- Photometer „SLT. RAINBOW“ mit Filter, Wellenlänge 405 nm, empfohlene Referenzwellenlänge im Bereich von 620 nm - 690 nm
- Inkubator für 37°C
- feuchte Kammer
- Präzisionspipetten für entsprechende Volumina (Eppendorf-Pipetten)
- Papiertücher
- Aqua bidest.
- Waschgerät
- saubere Glasgefäße
- Vortexer
- Abdeckfolie für Teststreifen

#### **5. 2. 2. 4 Testdurchführung**

Für die IgA- und für die IgG-Antikörperbestimmung gilt jeweils die gleiche Vorgehensweise. Die Proben werden in einer Verdünnung von 1:100 getestet. Zu je 1000 µl Verdünnungspuffer werden je 10 µl Patientenserum pipettiert (= 1:100), danach wird sorgfältig gemischt. Je 100 µl der verdünnten Proben sowie 100 µl der gebrauchsfertigen Kontroll- und Standardseren werden in die benötigten Kavitäten der Teststreifen pipettiert.

Dabei muß darauf geachtet werden, eine Kavität für den Substratleerwert freizulassen. Nun erfolgt eine Seruminkubation für 60 Minuten bei 37°C in der feuchten Kammer. Danach werden die Kavitäten mit einem geeigneten Waschautomaten viermal gewaschen. Nach dem Waschvorgang werden jeweils 100 µl des IgA-bzw. IgG-Konjugates, welches vorher 1+100 mit Verdünnungspuffer verdünnt wurde, in die entsprechenden Kavitäten pipettiert, wobei wieder der Substratleerwert ausgelassen werden muß. Anschließend wird für 30 Minuten bei 37°C in der feuchten Kammer inkubiert und danach erneut gewaschen. Die Substratzugabe von je 100 µl Substratlösung erfolgt in alle Kavitäten, auch die für den Substratleerwert. Wieder wird für 30 Minuten bei 37°C in der feuchten Kammer inkubiert. Die Substratreaktion wird durch Zugabe von je 100 µl Stopplösung beendet und die Mikrotiterplatte leicht geschüttelt, um zu mischen. Innerhalb der nächsten 60 Minuten hat die Extinktionsmessung bei 405 nm gegen den Substratleerwert zu erfolgen, wobei die Referenzwellenlänge im Bereich zwischen 620 nm und 690 nm (z. B. 650 nm) zu wählen ist.

Die Auswertung des Tests erfolgt automatisch mit SERION *easy base* 4PL-Software. Für IgG gilt: Ein positives Testergebnis liegt bei Werten  $> 7$  U/ml vor. Grenzwertig ist ein Ergebnis dann, wenn die Werte zwischen 5 bis 7 U/ml liegen. Negativ bewertet wird bei Werten  $< 5$  U/ml. Für IgA gilt: Ein positives Testergebnis liegt bei Werten  $> 4$  U/ml vor. Grenzwertig ist ein Ergebnis dann, wenn die Werte zwischen 3 bis 4 U/ml liegen. Negativ bewertet wird bei Werten  $< 3$  U/ml. In dieser Arbeit wurden sowohl für IgG als auch für IgA grenzwertige Ergebnisse wie positive Ergebnisse gewertet.



Im Rahmen dieser Arbeit wurden die folgenden Tests bzw. das Testmaterial zum Nachweis von IgM-Antikörpern gegen *C. pneumoniae* bzw. Chlamydien jeweils verglichen mit dem MIF-Test als Referenzmethode.

### **5. 2. 3 „*Chlamydia pneumoniae*-IgM-sElisa medac“-Test**

#### **5. 2. 3. 1 Allgemeines und Prinzip**

Der Test wird von der Firma Medac angeboten und soll dem Nachweis von IgM-Antikörpern gegen *C. pneumoniae* dienen, also um eine akute Infektion anzuzeigen, für die Antikörper dieser Klasse charakteristisch sind. Die Ergebnisse des Tests werden mit den Ergebnissen des MIF-Tests verglichen und der Test bewertet.

Der vorliegende Test arbeitet mit der ELISA-Technik. Es wird ein hochaufgereinigtes Antigen verwendet. Die Kavitäten der Mikrotiterplatte sind mit diesem *C. pneumoniae*-spezifischen Antigen beschichtet. Bei Zugabe von Patientenserum und dem Vorliegen von Antikörpern gegen *C. pneumoniae* in diesem Serum binden die Antikörper an das Antigen. Gibt man Anti-Human-IgM, welches mit dem Enzym Peroxidase gekoppelt ist, dazu, bindet sich diese Verbindung an die vorhandenen IgM-Antikörper. Nun wird mit TMB-Substrat inkubiert. Durch die enzymatische Reaktion erscheinen positive Proben blau. Die Reaktion wird danach mit Schwefelsäure gestoppt, wobei ein Farbumschlag von Blau nach Gelb erfolgt. Nun kann die photometrische Auswertung durchgeführt werden.

#### **5. 2. 3. 2 Materialien und Reagenzien**

Testkit enthält:

- Antigen-Teststreifen a 8 Kavitäten, Rundboden
- Negativkontrolle, humanes Serum, blau gefärbt und gebrauchsfertig
- Positivkontrolle, humanes Serum, blau gefärbt und gebrauchsfertig
- Waschpuffer
- Probenverdünnungspuffer, blau gefärbt und gebrauchsfertig
- Konjugat, Ziege-Anti-Human-IgM-Antikörper, rot gefärbt und gebrauchsfertig
- TMB-Substrat, gebrauchsfertig
- Stopplösung, gebrauchsfertig
- IgG/Rf-Absorbens, Schaf-Anti-Human-IgG-Antikörper, gebrauchsfertig

### **5. 2. 3. 3 Zusätzlich benötigte Materialien**

- Aqua bidest.
- Mikroliterpipetten für entsprechende Volumina (Eppendorf-Pipetten)
- saubere Glas- oder Kunststoffgefäße zum Verdünnen von Waschpuffer und Proben
- Waschgerät
- Inkubator für 37°C
- Photometer „SLT. RAINBOW“ mit Filtern für 450 nm und 620 nm - 650 nm
- Filterpapier

### **5. 2. 3. 4 Testdurchführung**

Die Patientenseren werden zur Absorption von IgG und Rf vorbehandelt. Je 10 µl Serum werden mit 240 µl Verdünnungspuffer verdünnt (=1:25). 30 µl dieses verdünnten Serums werden mit 30 µl IgG/Rf-Absorbens gemischt (Verdünnung 1:50) und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die vorliegende Testverdünnung ist 1:50.

Für die Ermittlung des Leerwertes pipettiert man in die erste Vertiefung 50 µl Probenverdünnungspuffer, in die zwei folgenden Vertiefungen je 50 µl Negativkontrolle, in die vierte Vertiefung 50 µl Positivkontrolle und dann fortlaufend je 50 µl der verdünnten Patientenproben. Anschließend wird in der feuchten Kammer 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Inkubation wird jede Vertiefung dreimal mit jeweils 200 µl Waschpuffer gewaschen und auf Filterpapier ausgeklopft. Je 50 µl des rot gefärbten Konjugates werden in die Vertiefungen pipettiert. Dann wird für 60 Minuten bei 37°C in der feuchten Kammer inkubiert. Danach erfolgt erneut der Waschvorgang, an den sich das Pipettieren von je 50 µl TMB-Substrat in jede Vertiefung anschließt. Im Dunkeln wird bei 37°C in der feuchten Kammer für 30 Minuten inkubiert. Nach der enzymatischen Reaktion erscheinen positive Proben blau. Die Reaktion wird durch Zugabe von jeweils 100 µl Stopplösung pro Vertiefung gestoppt, wobei ein Farbumschlag von Blau nach Gelb erfolgt. Nach dem Abwischen der Mikrovertiefungen von unten und dem Kontrollieren, daß keine Luftblasen in den Kavitäten vorhanden sind, wird innerhalb der nächsten 15 Minuten die photometrische Messung vorgenommen.

## **5. 2. 4 „Sero CP<sup>®</sup> IgM“-Test**

### **5. 2. 4. 1 Allgemeines und Prinzip**

Bei diesem Test handelt es sich um ein Verfahren der Firma Hain Diagnostika GmbH (Hain Diagnostika GmbH 2000). Auch dieser Test wird in der vorliegenden Arbeit mit dem MIF-Test bezüglich der Detektion von IgM-Antikörpern gegen *C. pneumoniae* verglichen und hinsichtlich der Ergebnisse bewertet.

Dem Test liegt die ELISA-Technik zugrunde. Die Vertiefungen der Mikrotiterplatte sind mit einem Antigen beschichtet. Als Antigen dienen Elementarkörperchen von *C. pneumoniae*. Bei Zugabe von Patientenserum binden vorhandene IgM-Antikörper gegen *C. pneumoniae* an das Antigen. Nach Zugabe von Konjugat, welches Antikörper gegen IgM, gekoppelt mit einem Enzym, enthält, werden diese Antikörper an das IgM des Patientensersums gebunden. Nun wird Substrat zugegeben. Die Enzyme an den Antikörpern des Konjugates setzen das Substrat um. Nach Zugabe der Stopplösung kann die photometrische Messung innerhalb von 30 Minuten im Photometer durchgeführt werden.

### **5. 2. 4. 2 Materialien und Reagenzien**

- Antigenteststreifen a 8 Kavitäten
- Waschpuffer-Konzentrat, farblos
- Serumverdünnung, gebrauchsfertig
- Konjugatverdünnung, gebrauchsfertig
- Negativkontrolle, gebrauchsfertig, blau
- Positivkontrolle, gebrauchsfertig, blau
- konzentriertes HRP-Konjugat
- TMB-Substrat, gebrauchsfertig
- Stopplösung, farblos

### **5. 2. 4. 3 Zusätzlich benötigte Materialien**

- Aqua bidest.
- Gefäße zur Serumverdünnung

- Gefäße zur Herstellung benötigter Lösungsverdünnungen
- Mikropipetten
- Multikanalpipetten
- Meßgefäße
- Vortexer
- Inkubator für 37°C
- feuchte Kammer
- Waschgerät
- Photometer „SLT. RAINBOW“ mit 450 nm-Filter und 620 nm Referenzfilter
- Plattendeckel

#### **5. 2. 4. 4 Testdurchführung**

Die Patientenseren werden 1:100 im Probenpuffer verdünnt. Dieser enthält zur Absorption von vorhandenen IgG-Antikörpern und Rheumafaktoren ein antihumanes IgG. Die Kontrollseren sind gebrauchsfertig. Nach einem Pipettierschema werden zuerst 50 µl Positivkontrollserum und dreimal Negativkontrollserum in die entsprechenden Kavitäten pipettiert, anschließend je 50 µl der 1:100 verdünnten Patientenseren. Die Platte wird abgedeckt und für eine Stunde bei 37°C in der feuchten Kammer inkubiert. Im Anschluß daran erfolgt das Waschen der Mikrotiterplatte in einem geeigneten Waschgerät. Es wird abgesaugt und dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Danach klopft man eventuell verbliebene Flüssigkeit aus. In jede Vertiefung wird je 50 µl verdünntes HRP-Konjugat einpipettiert, wobei das HRP-Konjugat kurz vorher im Verhältnis 1:300 verdünnt wurde. Wieder legt man die Abdeckung auf und inkubiert bei 37°C eine Stunde in der feuchten Kammer. Danach wird erneut abgesaugt, dreimal gewaschen und ausgeklopft. Nun werden jeweils 100 µl des gebrauchsfertigen TMB-Substrates in die Vertiefungen pipettiert, man legt die Abdeckung auf und läßt alles 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen. Direkt danach wird in jede Vertiefung 100 µl Stopplösung einpipettiert. Innerhalb der nächsten 30 Minuten können die Extinktionswerte im Photometer bei 450 nm (Referenzfilter 620 nm) bestimmt werden.

### **5. 2. 5 IgM-Testmaterial der Firma Virion/Serion**

Das IgM-ELISA-Kit von Virion/Serion wurde im Rahmen dieser Arbeit beim Vergleich der verschiedenen Testverfahren zum IgM-Antikörper-Nachweis gegen *C. pneumoniae* bzw. Chlamydien verwendet. Ein Test für die Bestimmungen von IgM-Antikörpern gegen *C. pneumoniae* der Firma Virion/Serion ist kommerziell nicht verfügbar. Für die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit stellte Virion/Serion einen IgG-Kit Ch VL Q 70 mit IgM-Konjugat Cl SER.79 zur Verfügung. Die Ergebnisse mit diesem Konjugat wurden mit den Ergebnissen des MIF-Tests verglichen.

Auch hier kam die ELISA-Technik zum Einsatz. Es wurde nach Rheumafaktorabsorption mit einer Serumverdünnung von 1:100 gearbeitet. Die Testdurchführung entspricht der IgA- und IgG-Antikörperbestimmung wie unter 5.2.2.1 beschrieben.

## 5. 3 STATISTIK

Die Statistik wird für den Vergleich der Ergebnisse der verschiedenen Nachweistests mit den Ergebnissen des Referenztests benötigt.

Wenn ein neuer Test mit einer Standardmethode verglichen wird, ist es üblich, die Ergebnisse mit Hilfe der errechneten Sensitivität und Spezifität auszudrücken sowie den positiven und negativen prädiktiven Wert anzugeben (Ridgway und Taylor-Robinson 1991). Für alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Testverfahren und das Testkonjugat wurden diese Parameter berechnet.

### 5. 3. 1 Sensitivität

Die Sensitivität ist die Wahrscheinlichkeit, daß ein Kranker testpositiv ist. Sie wird folgendermaßen berechnet:

$$\frac{\text{Richtigpos itive}}{\text{Kranke}} \times 100 = \frac{\text{Richtigpos itive}}{\text{Richtigpos itive} + \text{Falschnegative}} \times 100 \text{ [\%]}$$

(Vollandt 1999). Die Sensitivität stellt die Eignung des Tests dar, Personen mit einer fraglichen Krankheit möglichst vollständig herauszufiltern (Bühl und Zöfel 2002) und ist somit ein Maß für die Empfindlichkeit des Testverfahrens. Jeder Diagnosetest sollte über eine hohe Sensitivität verfügen, damit möglichst kein Kranker „übersehen“ wird.

### 5. 3. 2 Spezifität

Die Spezifität bezeichnet die Wahrscheinlichkeit, daß ein Gesunder testnegativ ist, und berechnet sich folgendermaßen:

$$\frac{\text{Richtigneg ative}}{\text{Gesunde}} \times 100 = \frac{\text{Richtigneg ative}}{\text{Richtigneg ative} + \text{Falschpositive}} \times 100 \text{ [\%]}$$

(Vollandt 1999). Sie stellt die Eignung des Tests dar, ausschließlich Personen mit einer fraglichen Krankheit zu erfassen und ist somit ein Maß für die Eindeutigkeit eines Tests. Eine hohe Spezifität ist wünschenswert.

### 5. 3. 3 Prädiktive Werte und Konfidenzintervalle

Bei Anwendung von diagnostischen Testverfahren interessiert vor allem der Krankheitszustand des Patienten, also die Aussage, ob ein Patient gesund oder krank ist, nachdem das Testergebnis vorliegt. Es interessiert die Wahrscheinlichkeit, ob das positive oder negative Testergebnis richtig ist. Vorhersagewerte (prädiktive Werte) liefern Wahrscheinlichkeiten, die aufgrund eines Testergebnisses oder -befundes auf den (Krankheits)Zustand des Patienten schließen lassen.

Der positive prädiktive Wert trifft eine Aussage über die Wahrscheinlichkeit, daß ein Testpositiver (als Kranker erkannt) wirklich krank ist. Die Formel zu seiner Berechnung lautet:

$$\frac{\text{Richtigpositive}}{\text{Testpositive}} \times 100 = \frac{\text{Richtigpositive}}{\text{Richtigpositive} + \text{Falschpositive}} \times 100 [\%]$$

Der negative prädiktive Wert sagt etwas aus über die Wahrscheinlichkeit, daß ein Testnegativer (als Gesunder klassifiziert) wirklich gesund ist. Er wird folgendermaßen berechnet:

$$\frac{\text{Richtignegative}}{\text{Testnegative}} \times 100 = \frac{\text{Richtignegative}}{\text{Richtignegative} + \text{Falschnegative}} \times 100 [\%]$$

(Vollandt 1999).

Es ist dabei wichtig zu wissen, daß der positive prädiktive Wert und der negative prädiktive Wert von der Prävalenz einer Infektion in der Population, die untersucht wird, abhängig sind. Bei höheren Prävalenzraten beispielsweise ist ein höherer positiver prädiktiver Wert zu erwarten, als bei kleinerer Prävalenz einer Infektion. Dies bedeutet, daß bei der Anwendung von Testverfahren in Populationen mit niedrigen Prävalenzraten der Test anfälliger für das Auftreten von falsch positiven Ergebnissen ist, als bei höheren Prävalenzen (Ridgway und Taylor-Robinson 1991). Die prädiktiven Werte sollten idealerweise für ein Testverfahren hoch sein.

Für einige Testergebnisse wurde das exakte 95%-Konfidenzintervall angegeben. Dieses stellt ein Intervall dar, welches den Parameter, der aus einer Stichprobe (in diesem Falle

einer bestimmten Anzahl von Seren) geschätzt wurde, mit einer Vertrauenswahrscheinlichkeit von 95% überdeckt.



## 6. ERGEBNISSE

### 6.1 „Serion ELISA *classic Chlamydia* IgA, IgG quant.“-TEST

Um den Test von Virion/Serion zu evaluieren, der zum Nachweis von Antikörpern der Klassen IgA und IgG gegen Chlamydien (bei respiratorischen Infektionen) eingesetzt werden soll, wurden insgesamt 300 Seren jeweils mit dem MIF-Test und diesem Test untersucht. Dabei stammten 100 Seren von Patienten mit der Diagnose Pneumonie oder atypische Pneumonie, 100 Seren von Patienten mit urogenitalen Infektionen und 100 Seren von Blutspendern.

Der Test von Virion/Serion wurde bei allen Seren zur Suche nach Antikörpern gegen Chlamydien durchgeführt. Dann wurden die Ergebnisse mit den Ergebnissen des MIF-Tests für die Suche nach Antikörpern gegen *C. pneumoniae* bzw. *C. trachomatis* verglichen. Die Testergebnisse des MIF-Tests galten als Vergleichsstandard. Sensitivität und Spezifität wurden für die Ergebnisse des Tests von Virion/Serion ebenso wie die prädiktiven Werte berechnet.

#### 6.1.1 Antikörpernachweis in Seren von Patienten mit Pneumonie

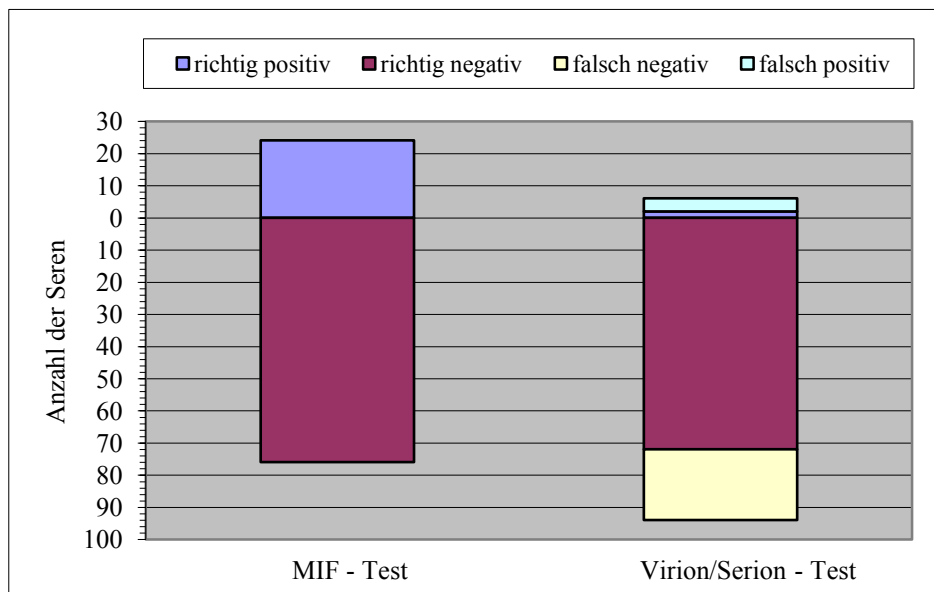
##### 6.1.1.1 IgG-Antikörper

Von den Seren der Patienten mit Pneumonie wurden mit dem MIF-Test 24 Seren als IgG-positiv für *C. pneumoniae* getestet. Positiv heißt, es lagen Antikörper gegen *C. pneumoniae* in einer Konzentration vor, die für eine klinisch relevante Infektion spricht. 76 Seren waren negativ, das heißt, mit Antikörpern gegen *C. pneumoniae* in einer Konzentration, die nicht klinisch relevant ist.

Mit dem Test von Virion/Serion wurden bei der Suche nach Antikörpern gegen Chlamydien von diesen 100 Seren nur 6 als positiv eingestuft. Davon waren 2 richtig positiv und 4 falsch positiv. 22 Seren sind somit falsch negativ bestimmt worden, 72 als richtig negativ. Tab. 1 und Abb. 1 veranschaulichen die Ergebnisse.

**Tab. 1: Seren von Patienten mit Pneumonie, Gesamt-IgG, Vergleich von MIF-Test und Virion/Serion-Test**

		MIF-Test		Summe
		positiv	negativ	
Virion/Serion-Test	positiv	2	4	6
	negativ	22	72	94
Summe		24	76	100

**Abb. 1: Seren von Patienten mit Pneumonie, Gesamt-IgG, Vergleich von MIF-Test und Virion/Serion-Test**

Unter dem Zugrundelegen der Formeln für Sensitivität und Spezifität ergeben sich für den Test von Virion/Serion für den IgG-Nachweis folgende Werte: Die Sensitivität beträgt  $0,083 = 8,3\%$ , das 95%-Konfidenzintervall (1,03%; 27%). Die Spezifität beträgt  $0,947 = 94,7\%$ , das 95%-Konfidenzintervall (87%; 98,5%).

Anhand der Ergebnisse kann abgeleitet werden, daß dieser Test besonders bei der Bestimmung positiver Seren versagt. Dies belegt die niedrige Sensitivität. Die Bestimmung der negativen Seren hingegen erfolgt relativ zuverlässig, was sich am hohen Wert der Spezifität zeigt. Dies jedoch wird begleitet von einer beträchtlichen Anzahl falsch negativer Seren.

Der positive prädiktive Wert für den IgG-Nachweis mit dem Virion/Serion-Test beträgt  $0,333 = 33,3\%$ , der negative prädiktive Wert  $0,765 = 76,5\%$ . Dies bedeutet, es besteht eine 33,3%-ige Wahrscheinlichkeit, daß ein als positiv gewertetes Serum wirklich positiv ist,

während die Wahrscheinlichkeit, daß ein negativ gewertetes Serum tatsächlich negativ ist, 76,5% beträgt.

Für den Nachweis von IgG-Antikörpern ergaben sich bei der Differenzierung in die einzelnen Titer folgende Werte:

Im MIF-Test hatten bei der Suche nach Antikörpern gegen *C. pneumoniae* 49 Seren einen Titer bis 1:16. Im Test von Virion/Serion lagen bei der Suche nach Antikörpern gegen Chlamydien 47 Seren (95,9%) mit diesem Titer vor, 2 Seren wurden falsch positiv bewertet. Die 47 Seren hatten einen Mittelwert der optischen Dichte von 0,095. Der Mittelwert der optischen Dichte für die 2 falsch positiven Seren betrug 0,429.

20 Seren hatten im MIF-Test einen Titer von 1:32, im Test von Virion/Serion waren es 18 (90%). Es sind 2 Seren falsch positiv bestimmt worden. Der Mittelwert der optischen Dichte der richtig negativen Seren betrug 0,117. Für die zwei falsch positiven Seren betrug er 0,753.

Von den 7 Seren mit einem Titer von 1:64 im MIF-Test wurden im Test von Virion/Serion alle (100%) erkannt. Der Mittelwert für die optische Dichte lag bei diesen 7 Seren bei 0,103.

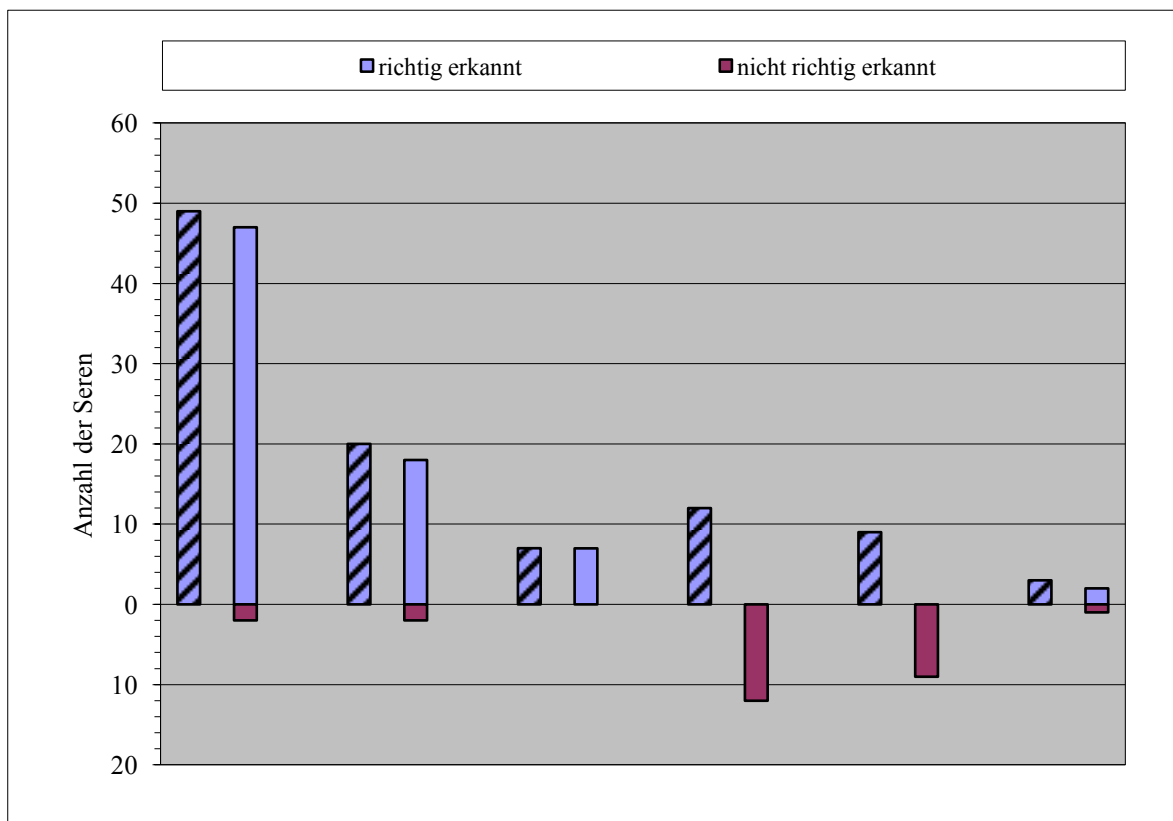
12 Seren hatten im MIF-Test einen Titer von 1:128, als antikörpertragend erkannt wurde im Virion/Serion-Test keines (0%) davon. 12 falsch negative Seren lagen vor. Der Mittelwert der bestimmten optischen Dichten lag hier bei 0,159.

Von den 9 Seren mit dem Titer 1:256 im MIF-Test wurde ebenfalls keines (0%) im Test von Virion/Serion als antikörpertragend erkannt, 9 Seren wurden falsch negativ bewertet. Der Mittelwert der optischen Dichten betrug hier 0,168. Der Titer 1:512 lag bei 3 Seren im MIF-Test vor, im Virion/Serion-Test wurden 2 Seren (66,6%) mit diesem Titer als positiv erkannt, 1 Serum war falsch negativ. Für die zwei richtig positiv bestimmten Seren betrug der Mittelwert der optischen Dichte 0,419, das falsch negative Serum hatte einen Wert der optischen Dichte von 0,143.

Tab. 2 und Abb. 2 zeigen diese Ergebnisse.

**Tab. 2: Seren von Patienten mit Pneumonie, IgG, Vergleich von MIF-Test und Virion/Serion-Test bei verschiedenen Titern**

Titer	MIF-Test	Virion/Serion-Test	nicht richtig erkannt
bis 1:16	49	47 95,9%	2 (FP)
1:32	20	18 90%	2 (FP)
1:64	7	7 100%	0
1:128	12	0 0%	12 (FN)
1:256	9	0 0%	9 (FN)
1:512	3	2 66,6%	1 (FN)



**Abb. 2 : Seren von Patienten mit Pneumonie, IgG, Vergleich von MIF-Test (schraffierte Balken) und Virion/Serion-Test (nicht schraffierte Balken) bei verschiedenen Titern**

Man erkennt, daß bei den antikörperfreien Seren und bei den Seren mit niedrigen Titern der Test von Virion/Serion gut die Ergebnisse des MIF-Tests nachvollzieht. Bei den

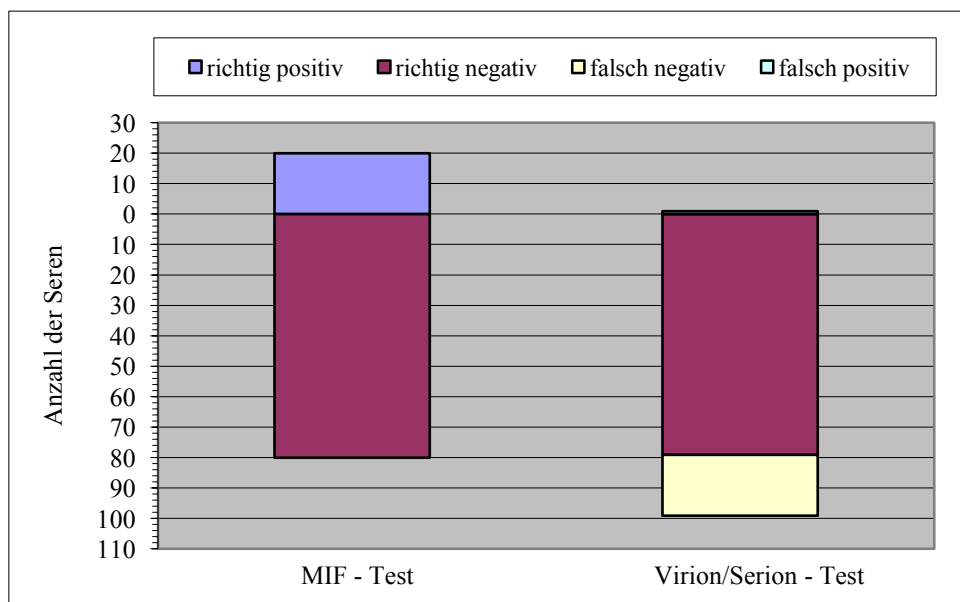
höheren Titern besteht gar keine Übereinstimmung mehr. Erst bei einem Titer von 1:512 besteht eine teilweise Übereinstimmung mit den Ergebnissen des MIF-Tests.

### 6. 1. 1. 2 IgA-Antikörper

Von den Pneumonieseren wurden mit dem MIF-Test 20 Seren als IgA-positiv für *C. pneumoniae* getestet. Es lagen also 20 positiv und 80 negativ bestimmte Seren vor. Im Test von Virion/Serion wurde bei der Suche nach Antikörpern gegen Chlamydien von diesen 100 Seren nur ein einziges als positiv eingestuft, dieses eine war falsch positiv. 99 Seren sind somit negativ bewertet worden. Davon waren 79 Seren richtig negativ und 20 falsch negativ eingeschätzt worden. Tab. 3 und Abb. 3 zeigen die Ergebnisse.

**Tab. 3: Seren von Patienten mit Pneumonie, Gesamt-IgA, Vergleich von MIF-Test und Virion/Serion-Test**

		MIF-Test		Summe
		positiv	negativ	
Virion/Serion-Test	positiv	0	1	1
	negativ	20	79	99
Summe		20	80	100



**Abb. 3: Seren von Patienten mit Pneumonie, Gesamt-IgA, Vergleich von MIF-Test und Virion/Serion-Test**

Die Sensitivität des Tests von Virion/Serion für IgA beträgt demnach 0% mit dem 95%-Konfidenzintervall (0%; 16,8%) und die Spezifität 98,7% mit einem 95%-Konfidenzintervall (93,2%; 99,9%).

Es zeigt sich, daß der Test von Virion/Serion bei Erkennung der positiven Seren versagt. Kein Serum wurde positiv bewertet, die Sensitivität beträgt 0%. Es liegt ein hoher Anteil falsch negativer Seren vor. Andererseits ist die Spezifität hoch, da negative Seren zuverlässig als solche erkannt werden.

Der positive prädiktive Wert des Tests von Virion/Serion für IgA beträgt  $0,00 = 0\%$ , der negative prädiktive Wert beläuft sich auf  $0,797 = 79,7\%$ . Die Wahrscheinlichkeit, daß ein positiv erkanntes Serum tatsächlich positiv ist, beträgt 0%. Die Wahrscheinlichkeit, mit der ein negativ erkanntes Serum wirklich negativ ist, liegt bei 79,7%.

Folgende Werte ergaben sich beim Nachweis von IgA-Antikörpern für die einzelnen Titer: Im MIF-Test wurden bei der Suche nach Antikörpern gegen *C. pneumoniae* 66 Seren mit einem Titer  $< 1:40$  gefunden. Bei der Suche nach Antikörpern gegen Chlamydien wurden im Virion/Serion-Test 65 (98,4%) davon als negativ erkannt (Mittelwert der optischen Dichten 0,070). Ein Serum wurde falsch positiv bewertet (optische Dichte 1,042).

Die 14 Seren mit einem Titer von 1:40 im MIF-Test erkannte der Test von Virion/Serion alle (100%) als richtig negativ, der Mittelwert der optischen Dichte betrug 0,094.

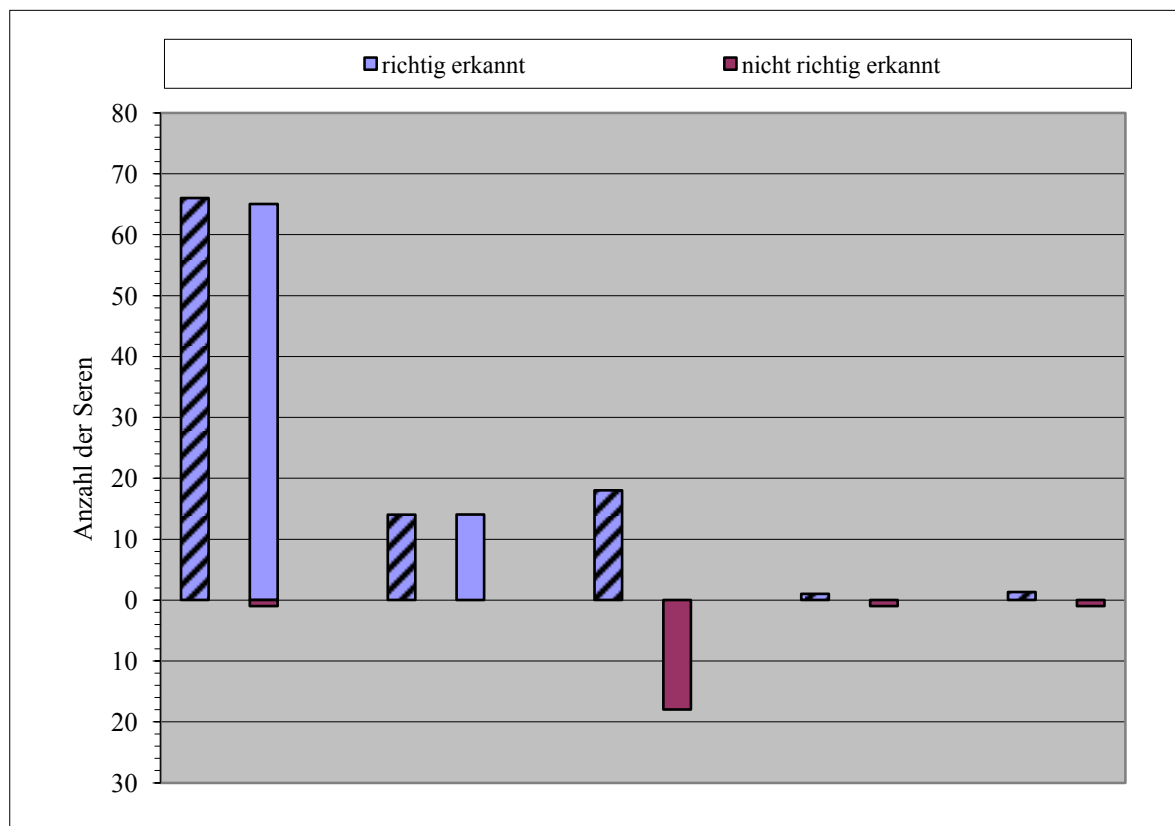
Von den 18 Seren mit Titer 1:80 im MIF-Test wurde keines (0%) mit dem Virion/Serion-Test als positiv gewertet, es ergaben sich 18 falsch negative Seren, deren Mittelwert der optischen Dichte bei 0,094 lag.

Je ein Serum wurde im MIF-Test beim Titer von 1:160 (optische Dichte 0,119) und 1:320 (optische Dichte 0,167) gefunden. Beide Seren wurden im Test von Virion/Serion nicht erkannt (0%), also jeweils falsch negativ gewertet.

In Tab. 4 und Abb. 4 werden die Ergebnisse dargestellt.

**Tab. 4: Seren von Patienten mit Pneumonie, IgA, Vergleich von MIF-Test und Virion/Serion-Test bei verschiedenen Titern**

Titer	MIF-Test	Virion/Serion-Test	nicht richtig erkannt
< 1:40	66	65 98,4%	1 (FP)
1:40	14	14 100%	0
1:80	18	0 0%	18 (FN)
1:160	1	0 0%	1 (FN)
1:320	1	0 0%	1 (FN)



**Abb. 4: Seren von Patienten mit Pneumonie, IgA, Vergleich von MIF-Test (schraffierte Balken) und Virion/Serion-Test (nicht schraffierte Balken) bei verschiedenen Titern**

Hier liegt bei den niedrigen Titern eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse des Tests von Virion/Serion mit denen des MIF-Tests vor. Ab einem Titer von 1:80 findet sich keine Übereinstimmung mehr. Der Test von Virion/Serion weist in den Seren mit höheren Titern keine Antikörper mehr nach.

## 6. 1. 2 Antikörpernachweis in Seren von Patienten mit urogenitalen Infektionen

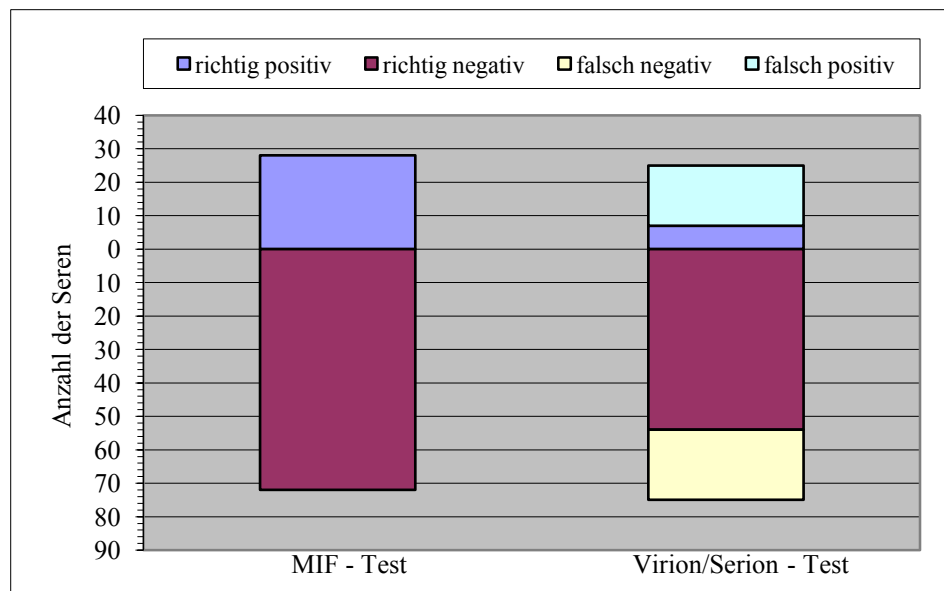
### 6. 1. 2. 1 IgG-Antikörper

Von den 100 Seren der urogenital erkrankten Patienten deklarierte der MIF-Test 28 als IgG-positiv für *C. trachomatis*, 72 Seren waren negativ.

Der Test von Virion/Serion erkannte bei der Suche nach Antikörpern gegen Chlamydien insgesamt 25 Seren als positiv, 7 davon richtig und 18 falsch positiv. 54 richtig negativ erkannten Seren stehen 21 falsch negativ bestimmte Seren gegenüber. Tab. 5 und Abb. 5 veranschaulichen die Ergebnisse.

**Tab. 5: Seren von Patienten mit urogenitalen Infektionen, Gesamt-IgG, Vergleich von MIF-Test und Virion/Serion-Test**

		MIF-Test		Summe
		positiv	negativ	
Virion/Serion-Test	positiv	7	18	25
	negativ	21	54	75
Summe		28	72	100



**Abb. 5: Seren von Patienten mit urogenitalen Infektionen, Gesamt-IgG, Vergleich von MIF-Test und Virion/Serion-Test**



Es ergibt sich nach den entsprechenden Formeln für die Sensitivität des Tests von Virion/Serion für IgG ein Wert von  $0,25 = 25\%$ ; 95%-Konfidenzintervall (10,6%; 44,8%) und für die Spezifität von  $0,75 = 75\%$ ; 95%-Konfidenzintervall (63,4%; 84,4 %).

Die Ergebnisse zeigen, daß bei der Erkennung positiver Seren insgesamt eine schlechte Übereinstimmung zwischen MIF-Test und dem Virion/Serion-Test besteht, was sich am Sensitivitätswert von 25% zeigt. Lediglich ein Viertel der positiven Seren wird vom Virion/Serion-Test als positiv erkannt. Die Erkennung der negativen Seren durch den Test von Virion/Serion ist besser, hier wurden drei Viertel der Seren richtig bewertet.

Der positive prädiktive Wert des Tests von Virion/Serion beträgt für IgG  $0,28 = 28\%$  und der negative prädiktive Wert beträgt  $0,72 = 72\%$ . Ein positiv gewertetes Serum ist folglich mit einer Wahrscheinlichkeit von 28% auch tatsächlich positiv. Für ein negativ gewertetes Serum beträgt die Wahrscheinlichkeit, tatsächlich negativ zu sein, 72%.

Für die IgG-Antikörper gegen *C. trachomatis* bzw. Chlamydien erhält man bei der Differenzierung in die einzelnen Titer folgende Ergebnisse:

Ein Titer bis 1:16 lag mit dem MIF-Test bei der Suche nach Antikörpern gegen *C. trachomatis* bei 33 Seren vor. Im Test von Virion/Serion wurden bei der Suche nach Antikörpern gegen Chlamydien 27 (81,8%; Mittelwert der optischen Dichten 0,142) davon erkannt. 6 Seren wurden falsch positiv gewertet (Mittelwert der optischen Dichten 0,574).

14 Seren hatten einen Titer von 1:32. Der Test von Virion/Serion wertete 8 Seren (57,1%; Mittelwert der optischen Dichten 0,177) davon richtig negativ und 6 Seren falsch positiv (Mittelwert der optischen Dichten 0,597).

Einen Titer von 1:64 hatten im MIF-Test 25 Seren. Im Test von Virion/Serion waren 19 Seren (76%; Mittelwert der optischen Dichten 0,159) richtig negativ. 6 Seren wurden nicht richtig erkannt und falsch positiv bewertet (Mittelwert der optischen Dichten 0,562).

11 Seren hatten im MIF-Test einen Titer von 1:128. Im Test von Virion/Serion wurden 3 (27,2%) davon als positiv erkannt, der Mittelwert der optischen Dichten dieser 3 Seren lag bei 0,968. 8 Seren mit diesem Titer blieben falsch negativ, der Mittelwert der optischen Dichten dieser Seren betrug 0,186.

Beim Titer von 1:256 erkannte der MIF-Test 8 Seren, der Test von Virion/Serion erkannte keines davon (0%), es blieben 8 Seren falsch negativ (Mittelwert der optischen Dichten 0,100).

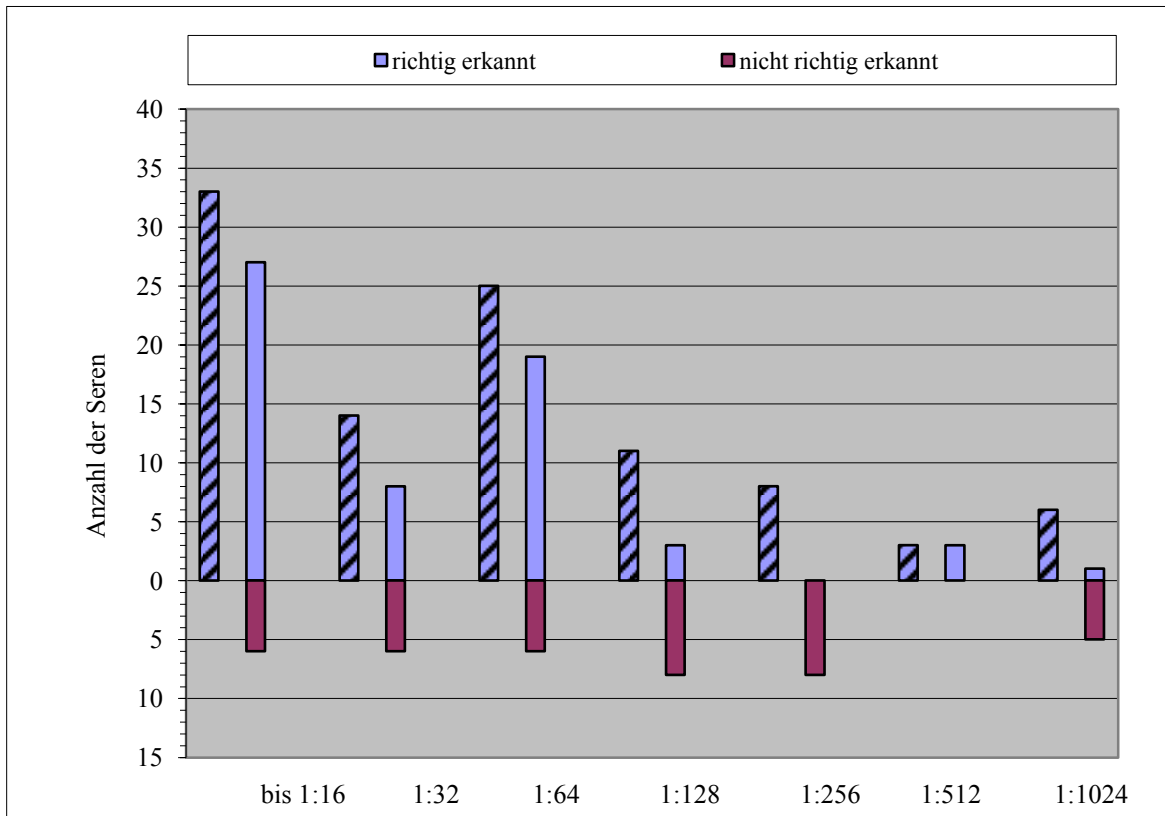
Von den 3 Seren des MIF-Tests mit dem Titer von 1:512 erkannte der Test von Virion/Serion alle Seren (100%; optische Dichte 1,058) als richtig positiv, kein Serum wurde falsch negativ bewertet.

Beim Titer von 1:1024 waren 6 Seren mit dem MIF-Test positiv gewertet worden. Der Test von Virion/Serion erkannte nur ein einziges Serum als positiv (16,6%, optische Dichte 2,082) und wertete 5 Seren fälschlicherweise negativ (Mittelwert der optischen Dichten 0,150).

Tab. 6 und Abb. 6 veranschaulichen die Ergebnisse.

**Tab. 6: Seren von Patienten mit urogenitalen Infektionen, IgG, Vergleich von MIF-Test und Virion/Serion-Test bei verschiedenen Titern**

Titer	MIF-Test	Virion/Serion-Test	nicht richtig erkannt
bis 1:16	33	27 81,8%	6 (FP)
1:32	14	8 57,1%	6 (FP)
1:64	25	19 76%	6 (FP)
1:128	11	3 27,2%	8 (FN)
1:256	8	0 0%	8 (FN)
1:512	3	3 100%	0
1:1024	6	1 16,6%	5 (FN)



**Abb. 6: Seren von Patienten mit urogenitalen Infektionen, IgG, Vergleich von MIF-Test (schraffierte Balken) und Virion/Serion-Test (nicht schraffierte Balken) bei verschiedenen Titern**

Bei den niedrigen Titern erkennt der Test von Virion/Serion zwischen 57,1% - 81,8% der Seren richtig. Bei den höheren Titern liegen die errechneten Prozentwerte zwischen 0% und 27,2%. Es werden immer weniger als ein Drittel der positiven Seren richtig erkannt. Es gibt bei den höheren Titern nur eine Ausnahme von der schlechten Erkennung: beim Titer von 1:512, wo alle 3 Seren richtig als positiv erkannt wurden.

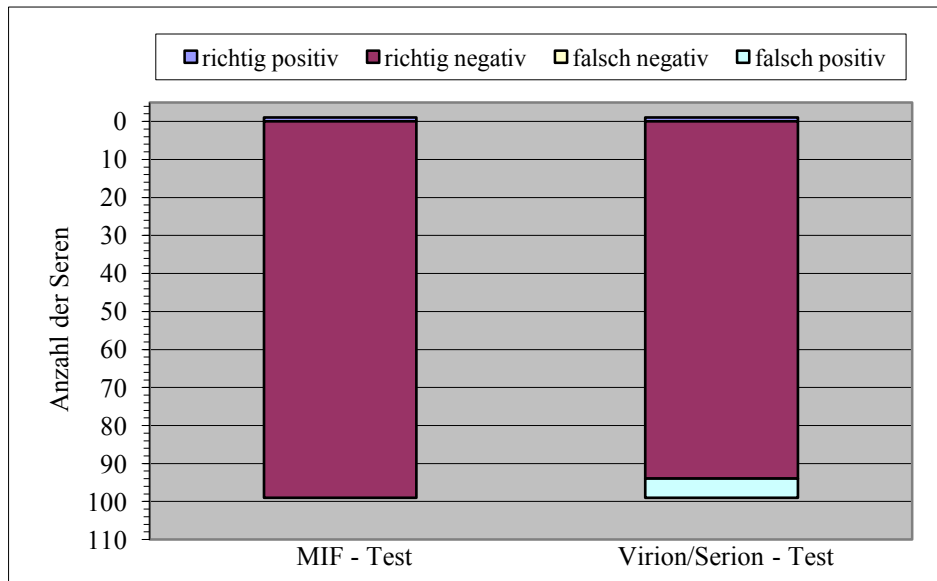
#### 6. 1. 2. 2 IgA-Antikörper

Von den 100 Seren der Seren von Patienten mit urogenitalen Infektionen war im MIF-Test nur 1 Serum IgA-positiv für *C. trachomatis*, 99 Seren waren negativ.

Der Test von Virion/Serion fand bei der Suche nach Antikörpern gegen Chlamydien insgesamt 6 positive Seren, 5 davon waren falsch positiv und ein Serum richtig positiv. 94 Seren waren negativ. Alle diese Seren waren richtig negativ, es gab keine falsch negativ bestimmten Seren. Tab. 7 und Abb. 7 stellen die Ergebnisse dar.

**Tab. 7: Seren von Patienten mit urogenitalen Infektionen, Gesamt-IgA, Vergleich von MIF-Test und Virion/Serion-Test**

		MIF-Test		Summe
		positiv	negativ	
Virion/Serion-Test	positiv	1	5	6
	negativ	0	94	94
Summe		1	99	100



**Abb. 7: Seren von Patienten mit urogenitalen Infektionen, Gesamt-IgA, Vergleich von MIF-Test und Virion/Serion-Test**

Für den Test von Virion/Serion ergibt sich für IgA eine Sensitivität mit dem Wert von 1,00 = 100% mit dem 95%-Konfidenzintervall (5,0%; 100%) und eine Spezifität mit einem Wert von 0,949 = 94,9% mit dem 95%-Konfidenzintervall (88,6%; 98,3%).

Die Erkennung des einen positiven Serums war im Test von Virion/Serion erfolgreich, was die Sensitivität von 100% zeigt, wobei dieser Wert wegen des nur einen positiven Serums mit Vorbehalt zu betrachten ist. Die negativen Seren werden vom Test von Virion/Serion fast alle als solche erkannt. Der Spezifitätswert von knapp 95% spiegelt dies wider.

Für IgA beträgt der positive prädiktive Wert des Tests von Virion/Serion 0,166 = 16,6%, der negative prädiktive Wert liegt bei 1,00 = 100%. Mit einer Wahrscheinlichkeit von 16,6% ist ein positiv gewertetes Serum tatsächlich positiv, ein negativ gewertetes Serum mit einer Wahrscheinlichkeit von 100% wirklich negativ.

Für den Nachweis der IgA-Antikörper zeigen sich bei der Differenzierung in einzelne Titer folgende Ergebnisse:

90 Seren mit einem Titer < 1:20 im MIF-Test stehen 88 (97,7%; Mittelwert der optischen Dichten 0,061) negativ erkannten Seren im Test von Virion/Serion gegenüber. 2 Seren waren vom Virion/Serion-Test falsch positiv bewertet worden (Mittelwert der optischen Dichten 0,299).

Der MIF-Test erkannte 7 Seren mit dem Titer von 1:20, der Test von Virion/Serion wertete nur 6 (85,7%; Mittelwert der optischen Dichten 0,152) dieser Seren als negativ, eines war falsch positiv (optische Dichte 0,562).

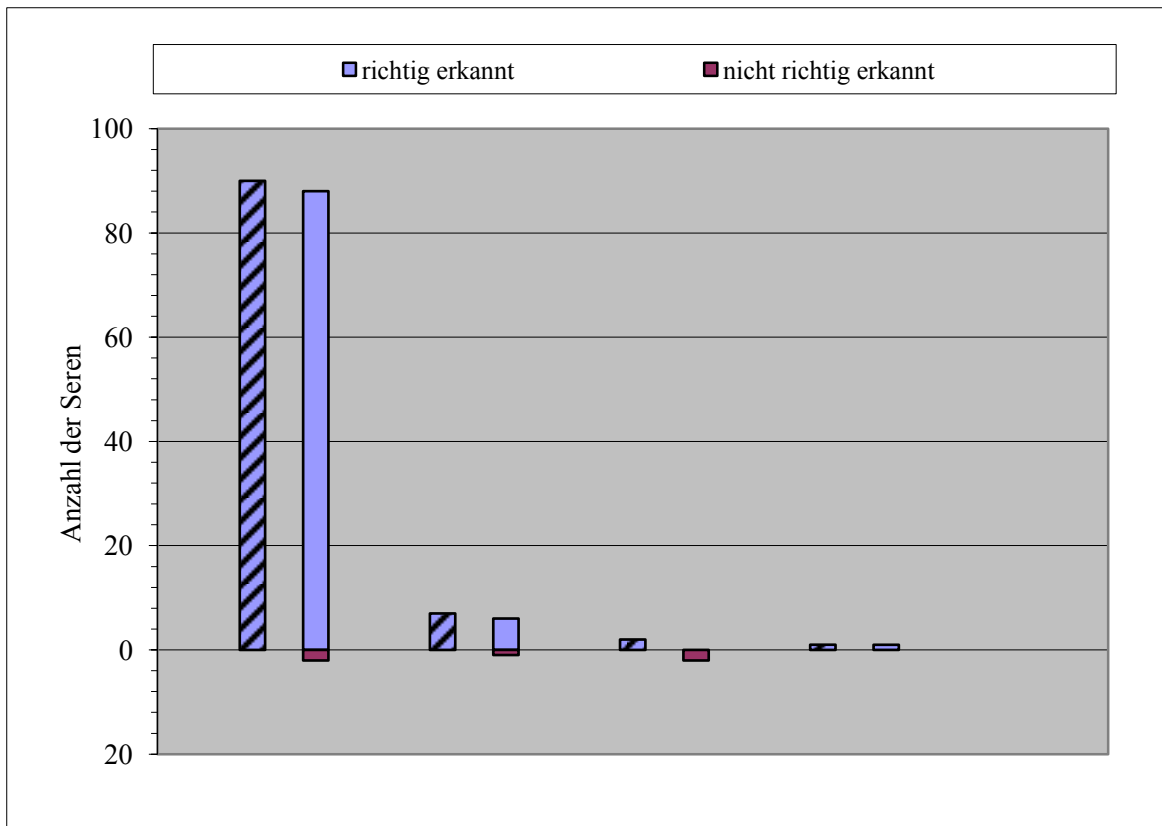
Der MIF-Test fand 2 Seren mit einem Titer von 1:40, die im Test von Virion/Serion beide falsch positiv gewertet wurden (Mittelwert der optischen Dichten 0,518), kein Serum (0%) wurde als negativ erkannt.

Der Titer 1:80 trat einmal. Das entsprechende Serum wurde vom Test von Virion/Serion auch (100%; optische Dichte 0,332) als positiv erkannt.

Tab. 8 und Abb. 8 zeigen die Ergebnisse.

**Tab. 8: Seren von Patienten mit urogenitalen Infektionen, IgA, Vergleich von MIF-Test und Virion/Serion-Test bei verschiedenen Titern**

Titer	MIF-Test	Virion/Serion-Test	nicht richtig erkannt
< 1:20	90	88 97,7%	2 (FP)
1:20	7	6 85,7%	1 (FP)
1:40	2	0 0,0%	2 (FP)
1:80	1	1 100,0%	0



**Abb. 8: Seren von Patienten mit urogenitalen Infektionen, IgA, Vergleich von MIF-Test (schraffierte Balken) und Virion/Serion-Test (nicht schraffierte Balken) bei verschiedenen Titern**

Die Ergebnisse zeigen, daß der Test von Virion/Serion die Seren mit einem Titer von unter 1:40 zuverlässig richtig erkennt. Fast alle negativen Seren werden als solche bewertet und es treten nur wenige falsch positiv bewertete Seren auf. Beim Titer von 1:80 gab es nur ein einziges positives Serum. Dieses erkannte der Test von Virion/Serion als solches. Insgesamt läßt sich die Qualität des Tests bei diesem Titer nicht gut beurteilen, da nur in einem einzigen Serum Antikörper vorlagen.

### **6. 1. 2. 3 Vergleich mit dem MIF-Test bei der Suche nach Antikörpern gegen *C. pneumoniae***

Die 100 Seren der Patienten mit urogenitalen Infektionen wurden mit dem MIF-Test außerdem auf Antikörper gegen *C. pneumoniae* untersucht. Die Ergebnisse des MIF-Tests wurden mit den Ergebnissen des Virion/Serion-Tests bei der Suche nach Antikörpern gegen Chlamydien verglichen. Der MIF-Test fand im IgG-Bereich 14 positive und 86 negative Seren. Der Test von Virion/Serion deklarierte 25 Seren als positiv und 75 als

negativ, davon waren 19 Seren falsch positiv und 6 richtig positiv sowie 8 falsch negativ und 67 richtig negativ bestimmt worden.

Im IgA-Bereich waren im MIF-Test 7 Seren positiv und 93 negativ, während der Virion/Serion-Test 6 positive und 94 negative Seren bestimmte. Dabei waren mit dem Test von Virion/Serion 5 Seren falsch positiv und ein Serum richtig positiv gewertet worden, während 6 Seren falsch negativ und 88 richtig negativ bestimmt worden.

Es ergab sich im IgG-Bereich für die Sensitivität des Virion/Serion-Tests ein Wert von  $0,428 = 42,8\%$ . Dies zeigt, daß nicht einmal die Hälfte aller positiven Seren erkannt wurde. Die Spezifität des Tests von Virion/Serion lag im IgG-Bereich bei  $0,779 = 77,9\%$ . Negative Seren wurden relativ zuverlässig erkannt. Der positive prädiktive Wert lag bei  $0,240 = 24\%$ , der negative prädiktive Wert belief sich auf  $0,893 = 89,3\%$ . Es besteht folglich nur eine geringe Wahrscheinlichkeit, daß ein vom Virion/Serion-Test positiv bewertetes Serum tatsächlich positiv ist. Ein negativ bewertetes Serum dagegen ist mit einer recht hohen Wahrscheinlichkeit wirklich negativ. Bei der Differenzierung in die einzelnen Titer zeigte der Test von Virion/Serion bei der Suche nach IgG-Antikörpern eine schlechte bis mittelmäßige Erkennung positiver Seren mit der weiten Spanne von  $16,6\%$  bis  $85,9\%$ , wobei vor allem die Übereinstimmung im Bereich der höheren Titer mangelhaft war.

Im IgA-Bereich betrug die Sensitivität des Virion/Serion-Tests  $0,142 = 14,2\%$  und die Spezifität  $0,940 = 94,6\%$ . Es wurde deutlich, daß nur ein sehr geringer Prozentsatz der positiven Seren durch den Test von Virion/Serion erkannt wird. Negative Seren werden relativ zuverlässig als solche vom Test von Virion/Serion erkannt. Der positive prädiktive Wert lag bei  $0,166 = 16,6\%$ , der negative prädiktive Wert bei  $0,936 = 93,6\%$ . Mit einer Wahrscheinlichkeit von  $16,6\%$  ist ein vom Test von Virion/Serion positiv erkanntes Serum tatsächlich positiv. Ein negativ erkanntes Serum ist mit einer Wahrscheinlichkeit von  $93,6\%$  wirklich negativ. Bei der Differenzierung in die einzelnen Titer beim Nachweis von IgA-Antikörpern erweist sich der Virion/Serion-Test als mittelmäßig bis schlecht bei der richtigen Erkennung der Seren ( $0\%$  und  $50\%$ ). Die Erkennung im Bereich der negativen Seren war etwas besser, während sie in den mittleren und höheren Titerstufen mangelhaft war.

Insgesamt liefert der Test von Virion/Serion auch hier wenig überzeugende Ergebnisse. Er zeigt nur eine geringe Übereinstimmung mit den Ergebnissen des MIF-Tests.



### 6. 1. 3 Antikörpernachweis in Seren von Blutspendern

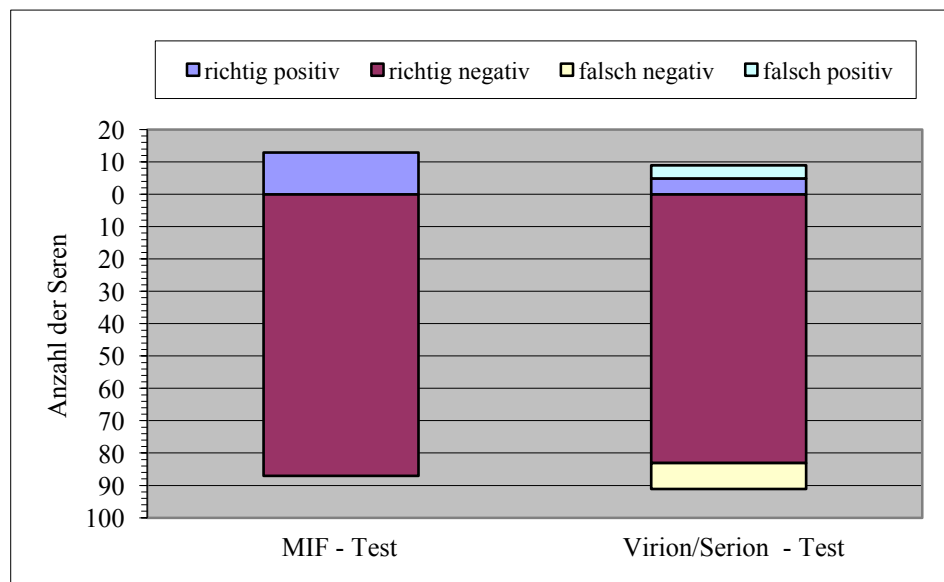
#### 6. 1. 3. 1 IgG-Antikörper

Von den 100 Seren der Blutspender wurden im MIF-Test bei der Suche nach Antikörpern gegen *C. pneumoniae* 13 Seren als IgG-positiv gewertet, 87 Seren waren negativ.

Mit dem Test von Virion/Serion fanden sich bei der Suche nach Antikörpern gegen Chlamydien 9 positive Seren, davon 5 richtig positiv und 4 falsch positiv. 8 Seren wurden falsch negativ bestimmt und 83 richtig negativ erkannt. Tab. 9 und Abb. 9 zeigen die Ergebnisse.

**Tab. 9: Seren der Blutspender, Gesamt-IgG, Vergleich von MIF-Test und Virion/Serion-Test**

		MIF-Test		Summe
		positiv	negativ	
Virion/Serion-Test	positiv	5	4	9
	negativ	8	83	91
Summe		13	87	100



**Abb. 9: Seren der Blutspender, Gesamt-IgG, Vergleich von MIF-Test und Virion/Serion-Test**

Für IgG ergibt sich beim Test von Virion/Serion eine Sensitivität von  $0,384 = 38,4\%$ , 95%-Konfidenzintervall (13,8%; 68,4%) und eine Spezifität von  $0,954 = 95,4\%$ ; 95%-Konfidenzintervall (88,6%; 98,7%).

Von den positiven Seren erkannte der Test von Virion/Serion nur einen bestimmten Anteil, was sich im Sensitivitätswert von 38,4% widerspiegelt. Mehr als die Hälfte der positiven Seren blieben unerkannt. Die negativen Seren hingegen konnte der Test von Virion/Serion zumeist richtig nachweisen, so daß die Spezifität einen hohen Wert erreicht.

Der positive prädiktive Wert des Tests von Virion/Serion für den IgG-Nachweis beträgt  $0,555 = 55,5\%$ , der negative prädiktive Wert  $0,912 = 91,2\%$ . Die Wahrscheinlichkeit, daß ein als positiv gewertetes Serum wirklich positiv ist, liegt bei 55,5%. Die Wahrscheinlichkeit, daß ein als negativ gewertetes Serum tatsächlich negativ ist, liegt bei 91,2%.

Beim Nachweis von Antikörpern der Klasse IgG ergaben sich bei der Differenzierung in die einzelnen Titer folgende Werte:

Einen Titer bis 1:16 hatten im MIF-Test 65 Seren. Der Test von Virion/Serion erkannte 63 Seren als negativ (96,9%; Mittelwert der optischen Dichten 0,109), 2 waren falsch positiv (Mittelwert der optischen Dichten 0,627).

Den Titer 1:32 hatten 12 Seren im MIF-Test. Im Test von Virion/Serion wurden 11 (91,6%; Mittelwert der optischen Dichten 0,150) davon als negativ erkannt und ein Serum falsch positiv bewertet (optische Dichte 0,392).

10 Seren hatten im MIF-Test einen Titer von 1:64. Im Test von Virion/Serion wurden davon 9 (90%; Mittelwert der optischen Dichten 0,143) Seren als negativ erkannt, während ein Serum (optische Dichte 0,786) falsch positiv bewertet wurde.

Beim Titer von 1:128, den 7 Seren im MIF-Test hatten, wurde im Test von Virion/Serion nur ein Serum (14,2%; optische Dichte 1,039) als positiv erkannt. 6 Seren blieben falsch negativ (Mittelwert der optischen Dichten 0,138).

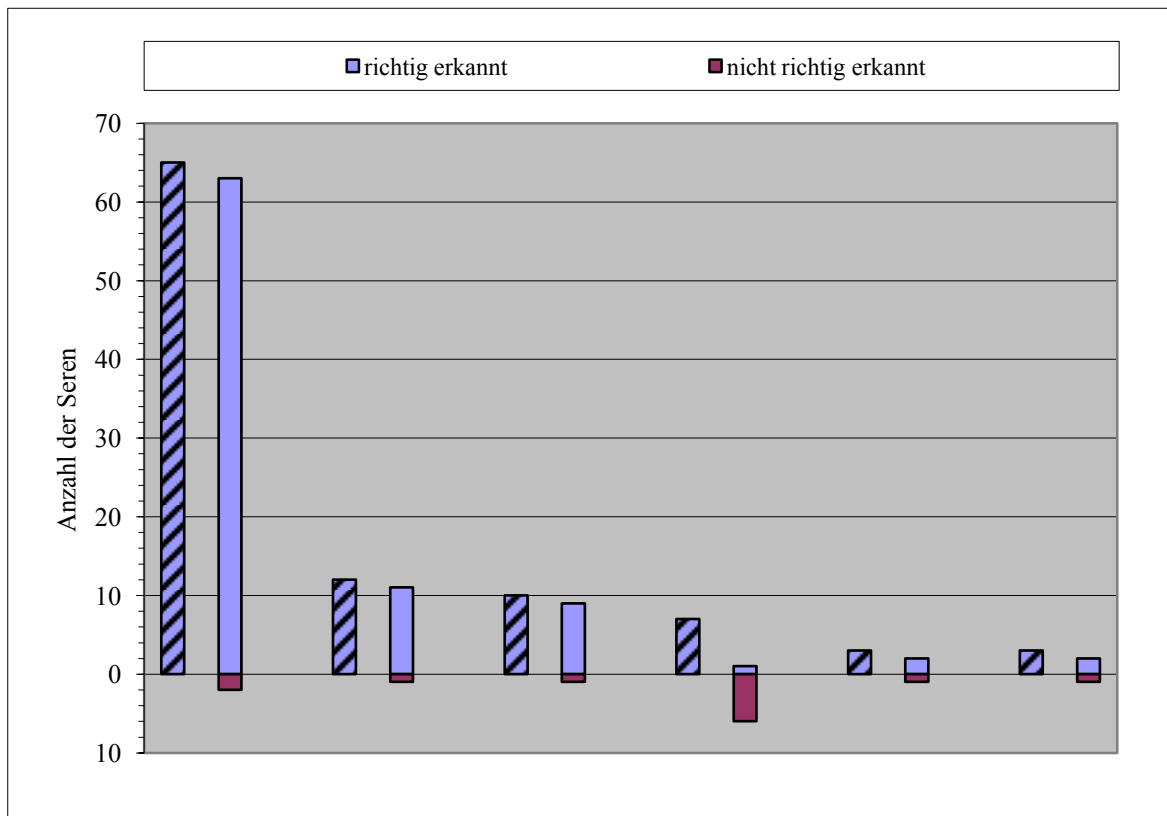
3 Seren hatten im MIF-Test einen Titer von 1:256, im Test von Virion/Serion waren es nur 2 (66,6%), deren Mittelwert der optischen Dichten 0,416 betrug. Ein Serum blieb falsch negativ (optische Dichte 0,134).

Gleiches gilt für den Titer von 1:512 (Mittelwert der optischen Dichten der 2 richtig positiven Seren 0,457, Wert der optische Dichte des einen falsch negativen Serums 0,328).

In Tab. 10 und Abb. 10 werden die Ergebnisse wiedergegeben.

**Tab. 10: Seren von Blutspendern, IgG, Vergleich von MIF-Test und Virion/Serion-Test bei verschiedenen Titern**

Titer	MIF-Test	Virion/Serion-Test	nicht richtig erkannt
bis 1:16	65	63 96,9%	2 (FP)
1:32	12	11 91,6%	1 (FP)
1:64	10	9 90,0%	1 (FP)
1:128	7	1 14,2%	6 (FN)
1:256	3	2 66,6%	1 (FN)
1:512	3	2 66,6%	1 (FN)



**Abb. 10: Seren von Blutspendern, IgG, Vergleich von MIF-Test (schraffierte Balken) und Virion/Serion-Test (nicht schraffierte Balken) bei verschiedenen Titern**

Man erkennt, daß der Test von Virion/Serion von den Seren mit niedrigen Titern immer mindestens 90% der Seren richtig erkennt. Beim Titer von 1:128 erkennt der Test von Virion/Serion nur einen Anteil von etwa 14% der Seren richtig. In den höheren Titern gelingt der Nachweis etwas besser, es werden 66,6% der Seren richtig durch den Test von Virion/Serion erkannt.

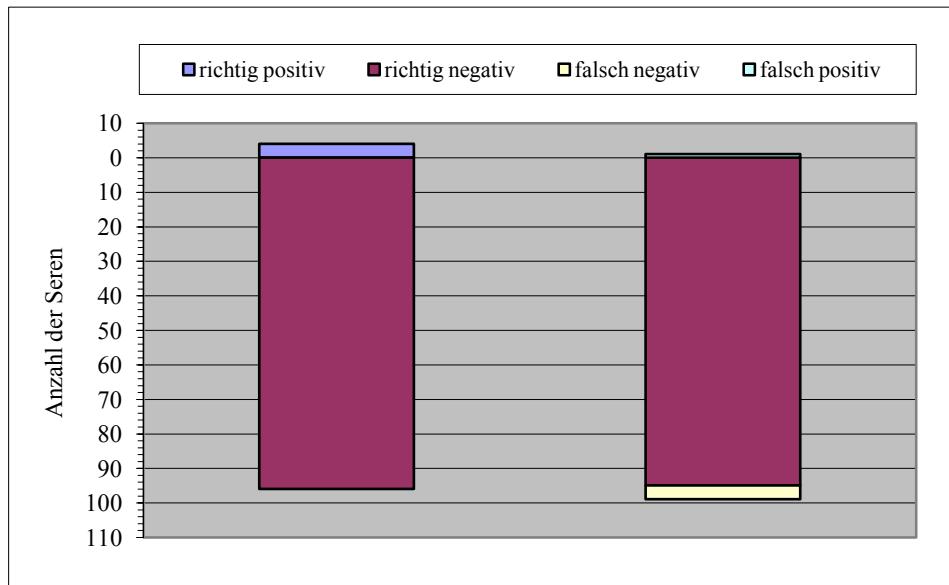
### 6. 1. 3. 2 IgA-Antikörper

Von den Seren der Blutspender wertete der MIF-Test bei der Suche nach Antikörpern gegen *C. pneumoniae* 4 Seren als IgA-positiv und 96 als negativ.

Im Test von Virion/Serion wurden 99 negative Seren, davon 4 falsch und 95 richtig erkannte, und ein falsch positives Serum gefunden. Tab. 11 und Abb. 11 verdeutlichen die Ergebnisse.

**Tab. 11: Seren der Blutspender, Gesamt-IgA, Vergleich von MIF-Test und Virion/Serion-Test**

		MIF-Test		Summe
		positiv	negativ	
Virion/Serion-Test	positiv	0	1	1
	negativ	4	95	99
Summe		4	96	100



**Abb. 11: Seren der Blutspender, Gesamt-IgA, Vergleich von MIF-Test und Virion/Serion-Test**

Die Sensitivität des Tests von Virion/Serion für IgA beträgt somit 0%, 95%-Konfidenzintervall (0%; 60,2%), während die Spezifität bei 98,9% mit einem 95%-Konfidenzintervall (94,3%; 99,9%) liegt.

Auch hier wird deutlich, daß der Test von Virion/Serion nicht in der Lage ist, die positiven Seren sicher nachzuweisen, denn es wird keines davon gefunden. Die Sensitivität liegt dementsprechend bei 0%. Die Spezifität wiederum ist mit fast 99% sehr hoch. Der Test bewertet negative Seren richtig als solche.

Der Test von Virion/Serion hat für IgA einen positiv prädiktiven Wert von  $0,00 = 0\%$  und einen negativ prädiktiven Wert von  $0,959 = 95,9\%$ . Es besteht eine Wahrscheinlichkeit von 0%, daß ein als positiv gewertetes Serum tatsächlich positiv ist, und eine Wahrscheinlichkeit von 95,9%, daß ein als negativ gewertetes Serum wirklich negativ ist.

Beim Nachweis von IgA ergaben sich bei der Differenzierung in die einzelnen Titer folgende Werte:

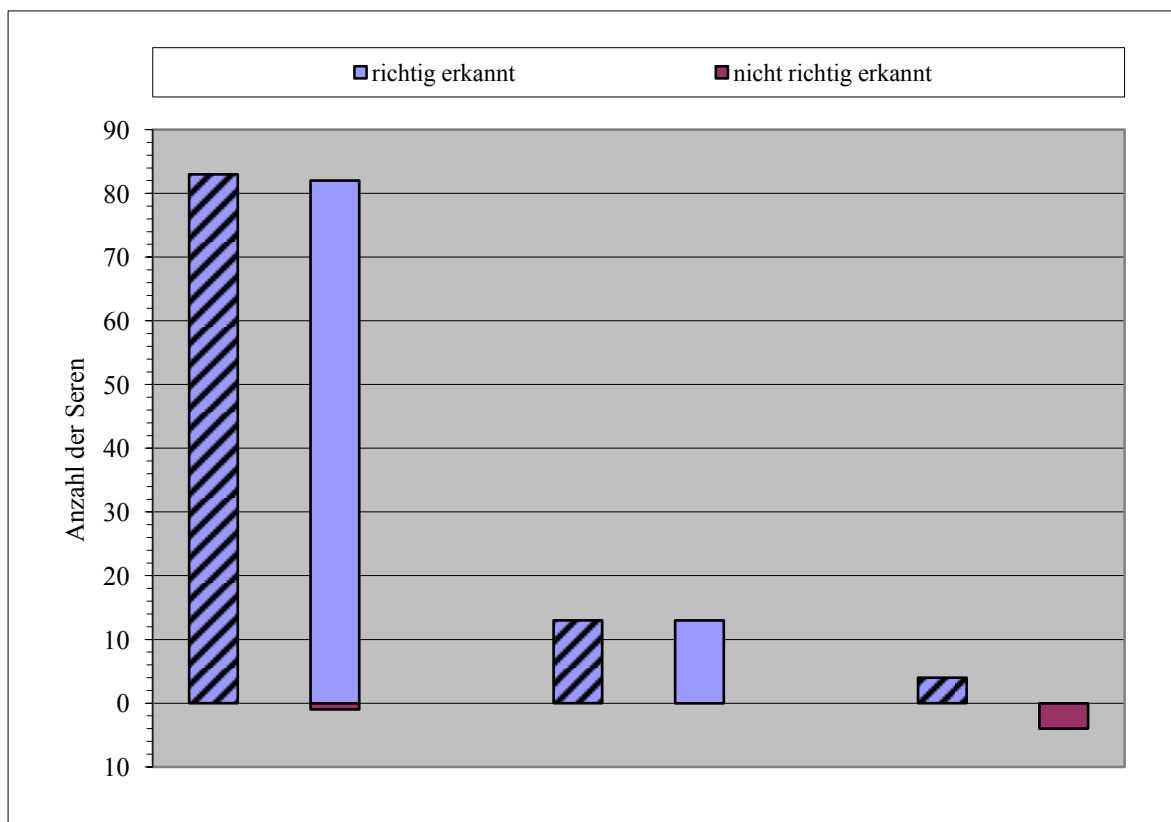
Die 83 negativ bestimmten Seren des MIF-Tests wurden bis auf ein falsch positiv bestimmtes Serum (optische Dichte 0,254) im Test von Virion/Serion ebenfalls negativ gewertet (98,7%; Mittelwert der optischen Dichten 0,082). Die 13 im MIF-Test einem Titer von unter 1:80 zugeordneten Seren bewertete der Test von Virion/Serion alle als negativ (100%; Mittelwert der optischen Dichten 0,190).

Die 4 Seren mit einem Titer von 1:80 im MIF-Test konnte der Test von Virion/Serion nicht finden, sie wurden falsch negativ bewertet (0%; Mittelwert der optischen Dichten 0,100).

Tab. 12 und Abb. 12 präsentieren die Ergebnisse.

**Tab. 12: Seren von Blutspendern, IgA, Vergleich von MIF-Test und Virion/Serion-Test bei verschiedenen Titern**

Titer	MIF-Test	Virion/Serion-Test	nicht richtig erkannt
negativ	83	82 98,7%	1 (FP)
< 1:80	13	13 100,0%	0
1:80	4	0 0,0%	4 (FN)



**Abb. 12: Seren von Blutspendern, IgA, Vergleich von MIF-Test (schraffierte Balken) und Virion/Serion-Test (nicht schraffierte Balken) bei verschiedenen Titern**

Der Test von Virion/Serion vollzieht bei den nicht antikörperhaltigen Seren und beim Titer von unter 1:80 die Ergebnisse des MIF-Tests gut nach, denn die Übereinstimmung der

Ergebnisse beträgt mindestens 98%. Beim Titer von 1:80 findet der Test von Virion/Serion kein einziges der antikörpertragenden Seren, hier schneidet er schlecht ab.

#### **6. 1. 4 Zusammenfassung**

Die Ergebnisse der Untersuchungen in den verschiedenen Diagnosegruppen mit dem Test von Virion/Serion und dem MIF-Test als Referenzmethode lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

Der Test von Virion/Serion lieferte in der Gruppe der Pneumonieseren beim Nachweis von IgG- und IgA-Antikörpern gegen Chlamydien ähnliche Ergebnisse. Die Sensitivität ist nur gering (8,33%) bzw. beträgt 0%. Positive Seren werden nur sehr unzuverlässig erkannt und es liegen dementsprechend viele falsch negative Bewertungen vor. Der Test zeigt sich wenig empfindlich.

Die Spezifität ist jeweils recht hoch (94,7% und 98,7%). Das bedeutet, negative Seren werden recht zuverlässig als solche erkannt, was für die Eindeutigkeit des Tests spricht.

Der positive prädiktive Wert ist klein (33%) bzw. beträgt 0%. Dies besagt, daß für ein positiv bewertetes Serum nur eine geringe bzw. gar keine Wahrscheinlichkeit besteht, wirklich positiv zu sein, hier besteht keine Zuverlässigkeit des Tests.

Die negativ prädiktiven Werte liegen höher (76,5% und 79,7%), es besteht eine recht hohe Wahrscheinlichkeit, daß ein negativ gewertetes Serum wirklich negativ ist.

Bei der Differenzierung in die verschiedenen Titer fällt auf, daß die Seren im negativen Bereich und in den unteren Titern noch relativ zuverlässig richtig erkannt werden, in den höheren Titern aber keine gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen des Referenztests vorliegt und die Zuverlässigkeit folglich gering ist.

Der Test von Virion/Serion lieferte bei den Seren von Patienten mit urologischen Infektionen ähnliche Ergebnisse wie bei den Seren der Pneumoniepatienten.

Bei der Suche nach IgG-Antikörpern erweist sich der Test von Virion/Serion mit einer Sensitivität von 25% als wenig sensitiv. Nur ein Viertel der positiven Seren wird erkannt. Viele Seren bleiben falsch negativ, aber es werden auch viele Seren fälschlicherweise positiv bewertet. Die Spezifität des Tests von Virion/Serion beträgt 75%, drei Viertel der negativen Seren werden auch als solche erkannt.

Der positiv prädiktive Wert fällt mit 28% ziemlich gering aus. Ein positiv bewertetes Serum ist nur mit einer kleinen Wahrscheinlichkeit wirklich positiv.

Mit 72% liegt der negativ prädiktive Wert höher, ein negativ bewertetes Serum ist mit einer relativ hohen Wahrscheinlichkeit wirklich negativ.

Bei der Differenzierung in die einzelnen Titer zeigt sich, daß der Test von Virion/Serion die nicht antikörperhaltigen Seren und die Seren mit niedrigen Titern mit einer Spanne von 57,1% bis 81,1% richtig bewertet, bei den höheren Titern die antikörpertragenden Seren aber unzuverlässig (0% bis 27,2%) nachweist. Es werden immer weniger als ein Drittel richtige Ergebnisse erzielt. Es gab nur beim Titer von 1:512 eine Ausnahme, hier wurden alle drei positiven Seren auch als solche erkannt.

Es gab im MIF-Test nur ein IgA-positives Serum, welches der Test von Virion/Serion auch als solches bewertete. Es ergibt sich demzufolge eine Sensitivität von 100%. Dieses Ergebnis ist nur mit Vorbehalt als Hinweis für hohe Testzuverlässigkeit bzw. Testempfindlichkeit zu interpretieren, da ja lediglich ein einziges Serum positiv war.

Es wurden mehrere Seren falsch positiv gewertet. Negative Seren sind ansonsten relativ zuverlässig als solche erkannt worden. Die Spezifität liegt bei 94,9%. Da das einzige positive Serum als solches erkannt wurde, gab es keine falsch negativ bestimmten Seren.

Der positiv prädiktive Wert (16,6%) zeigt, daß positiv gewertete Seren nur mit geringer Wahrscheinlichkeit tatsächlich positiv sind, hier arbeitet der Test von Virion/Serion unzuverlässig. Für den negativ prädiktiven Wert (100%) kann wieder nur mit Vorbehalt eine Interpretation vorgenommen werden, da es nur ein richtig positives Serum gab und keine falsch negativen Seren vorlagen. Die Wahrscheinlichkeit von 100%, daß ein negativ bewertetes Serum wirklich negativ ist, bleibt also kritisch zu bewerten.

Bei der Differenzierung in die einzelnen Titer lag eine relativ gute Erkennung der Antikörper in den unteren Titerbereichen bzw. bei antikörperfreien Seren vor. Beim Titer von 1:40 wurde kein Serum als antikörpertragend erkannt. Beim Titer von 1:80 enthielt nur ein einziges Serum Antikörper. Dieses wurde erkannt. Da nur ein einziges Serum mit diesem Titer vorlag, ist das Ergebnis kritisch zu werten.

Betrachtet man diese Diagnosegruppe unter Vorbehalt bezüglich des einen positiven Serums im IgA-Bereich und den damit zusammenhängenden Werten, kann zusammenfassend gesagt werden, daß sich auch hier für IgG und IgA eine ähnliche Situation ergibt. Die Sensitivität ist gering. Die Spezifität ist relativ hoch, der Test relativ eindeutig. Der positiv prädiktive Wert ist niedrig und der negativ prädiktive Wert hoch. Es besteht eine geringe Wahrscheinlichkeit, daß positiv erkannte Seren wirklich positiv sind



und eine relativ hohe Wahrscheinlichkeit, daß negativ erkannte Seren tatsächlich negativ sind. In den unteren Titern erkennt der Test von Virion/Serion die Seren zum großen Teil richtig, während in den höheren Titern der Test schlechte Ergebnisse liefert.

Mit dem MIF-Test wurde in dieser Diagnosegruppe auch nach Antikörpern gegen *C. pneumoniae* gesucht. Die dabei erzielten Ergebnisse wurden mit denen des Tests von Virion/Serion für die Suche nach Antikörpern gegen Chlamydien verglichen. Dabei schnitt der Virion/Serion-Test ähnlich ab wie beim Vergleich mit dem MIF-Test bei der Suche nach Antikörpern gegen *C. trachomatis*.

Der Test von Virion/Serion zeigte im Vergleich zu den Ergebnissen des MIF-Tests bei der Suche nach Antikörpern gegen *C. pneumoniae* auch bei den Seren der Blutspender für die IgG- und IgA-Antikörperbestimmung gegen Chlamydien ähnliche Ergebnisse.

Die Sensitivität ist im IgG-Bereich relativ gering (38,4%) und beträgt im IgA-Bereich 0%. Positive Seren werden durch den Test von Virion/Serion nur ungenügend oder gar nicht erkannt, einige Seren bleiben falsch negativ. Die Spezifität des Tests von Virion/Serion liegt jeweils recht hoch (95,4% und 98,9%), negative Seren werden relativ zuverlässig wirklich als negativ erkannt. Es gibt einige falsch positive Seren. Zu beachten ist, daß – vor allem im IgA-Bereich – nur eine geringe Anzahl von MIF-positiven Seren vorlag, was zur zurückhaltenden Interpretation Anlaß geben sollte. Der Test von Virion/Serion zeigt sich hier gering bzw. gar nicht empfindlich, obgleich er eine hohe Eindeutigkeit aufweist.

Die positiv prädiktiven Werte des Tests von Virion/Serion betragen 55,5% und 0%. Das bedeutet, der Test zeigt im IgG-Bereich eine Wahrscheinlichkeit von 55,5%, daß positive Seren wirklich positiv sind. Im IgA-Bereich beträgt die Wahrscheinlichkeit, daß ein als positiv gewertetes Serum tatsächlich positiv ist, 0%. Der positive Vorhersagewert läßt diesbezüglich auf einen nur mittelmäßig bis nicht zuverlässigen Test schließen.

Beim negativ prädiktiven Wert erreicht der Test von Virion/Serion jeweils recht hohe Werte (91,2% und 95,9%). Negativ gewertete Seren haben eine relativ hohe Wahrscheinlichkeit, tatsächlich negativ zu sein.

Bei der Differenzierung in die einzelnen Titer erkannte der Test von Virion/Serion die nicht antikörpertragenden Seren bzw. die Seren mit niedrigen Titern relativ gut, in den höheren Titerstufen jedoch fand er die antikörpertragenden Seren nur vereinzelt oder gar nicht.

Im IgG-Bereich werden bei den 2 höchsten Titern jeweils zwei Drittel der antikörpertragenden Seren richtig erkannt, wobei jedoch die geringe Serenzahl von 3 Stück zu beachten ist.

Es lässt sich zusammenfassend schließen, daß der Test von Virion/Serion sowohl bei der Suche nach IgG-Antikörpern als auch beim Auffinden von IgA-Antikörpern ähnliche Werte erreicht. Bis auf wenige Ausnahmen zeigt er eine geringe Sensitivität, die Empfindlichkeit des Tests ist gering. Positive Seren werden nicht sicher als solche erkannt. Die Spezifität, Eindeutigkeit, des Tests ist relativ hoch, negative Seren erkennt der Test von Virion/Serion relativ gut als solche. Der positiv prädiktive Wert ist gering, positiv bestimmte Seren sind nur mit kleiner Wahrscheinlichkeit tatsächlich positiv. Der negativ prädiktive Wert ist relativ hoch. Für Seren, die negativ gewertet wurden, besteht eine relativ hohe Wahrscheinlichkeit, wirklich negativ zu sein. Seren mit niedrigen Titern werden zumeist richtig bewertet. Bei den höheren Titern besteht bis auf wenige Ausnahmen eine schlechte Erkennung der antikörpertragenden Seren.

## 6. 2 TESTE ZUM NACHWEIS VON *CHLAMYDIA*-SPEZIFISCHEM IgM

Für die Beurteilung der Diagnostik einer Infektion mit *C. pneumoniae* durch Nachweis von Antikörpern der IgM-Klasse mit verschiedenen Tests wurden 72 Seren ausgewählt.

Alle Seren wurden mit dem MIF-Test und anschließend jeweils mit einem Test der Firmen Hain Diagnostika GmbH und Medac sowie mit einem IgM-Testkonjugat von Virion/Serion untersucht. Der MIF-Test diente auch bei dieser Fragestellung als Referenzverfahren. Mit seinen Ergebnissen wurden jeweils die Ergebnisse der zwei untersuchten Tests bzw. des Konjugates verglichen. Außerdem wurden Sensitivität und Spezifität sowie die positiven und negativen prädiktiven Werte berechnet.

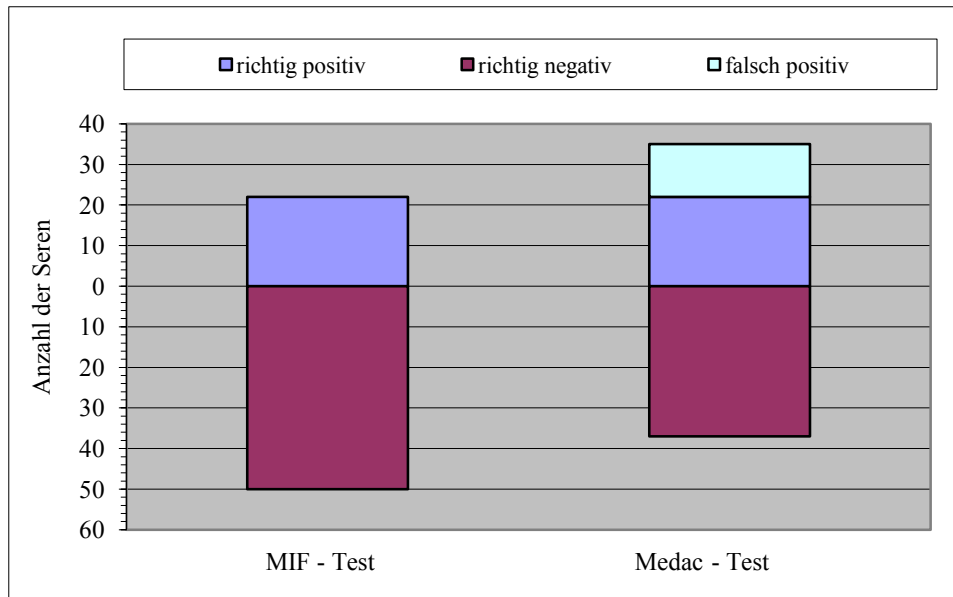
Im MIF-Test wurden 50 negative Seren und 22 reaktive (positive) Seren gefunden. Die Verteilung auf die einzelnen Titer war dabei folgende: 33 Seren waren nicht antikörpertragend, 17 zeigten einen Titer von 1:20, es gab also 50 negative Seren (ohne klinisch relevante Antikörperkonzentration). 14 Seren hatten einen Titer von 1:40 und jeweils 4 Seren einen Titer von 1:80 und 1:160.

### 6. 2. 1 „*Chlamydia pneumoniae*-IgM-sELISA medac“-Test

In diesem Test der Firma Medac waren gegenüber den 22 positiven Seren im MIF-Test 35 Seren positiv, 22 davon richtig und 13 falsch. 37 Seren wurden negativ bewertet, alle 37 richtig. Kein Serum wurde falsch negativ bestimmt. Tab. 13 und Abb. 13 veranschaulichen die Ergebnisse.

**Tab. 13: Vergleich der IgM-Gesamtergebnisse von MIF-Test und Medac-Test**

		MIF-Test		Summe
		positiv	negativ	
Medac-Test	positiv	22	13	35
	negativ	0	37	37
Summe		22	50	72



**Abb. 13: Vergleich der IgM-Gesamtergebnisse von MIF-Test und Medac-Test**

Die Sensitivität des Medac-Tests beträgt 100%; 95%-Konfidenzintervall (84,5%; 100%). Die Spezifität beträgt 74%; 95%-Konfidenzintervall (59,6%; 85,3%).

Der Medac-Test vollzieht bei den antikörpertragenden Seren die Ergebnisse des MIF-Tests sehr gut nach, denn alle positiven Seren wurden erkannt, was der Sensitivitätswert von 100% zeigt. Die negativen Seren wurden jedoch nicht immer als solche erkannt, es wurden einige Seren fälschlicherweise als positiv bewertet. Die Spezifität beträgt 74%.

Der positive prädiktive Wert des Medac-Tests liegt bei  $0,628 = 62,8\%$ . Der negative prädiktive Wert beträgt  $1,00 = 100\%$ . Die Wahrscheinlichkeit, daß ein als positiv gewertetes Serum tatsächlich positiv ist, beträgt 62,8%. Mit 100% Wahrscheinlichkeit ist ein als negativ gewertetes Serum tatsächlich negativ.

Bei der Differenzierung der Ergebnisse in die einzelnen Titer ergaben sich folgende Werte: 29 (87,8%) der 33 im MIF-Test nicht antikörperhaltigen Seren wurden richtig als negativ erkannt, 4 falsch positiv bewertet.

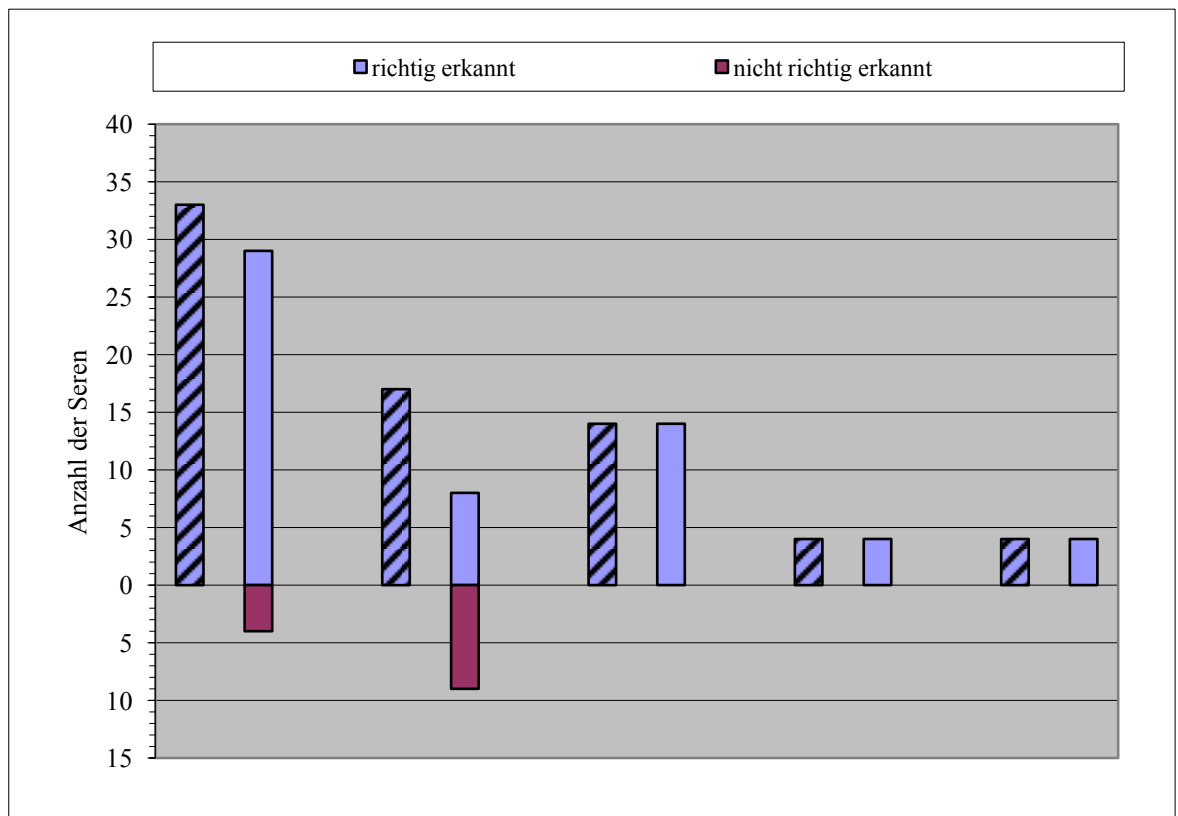
Von den 17 Seren mit Titer 1:20 im MIF-Test wurden 8 (47,0%) richtig als negativ erkannt und 9 fälschlicherweise positiv bewertet.

Die 14 Seren mit dem Titer von 1:40 sowie die je 4 Seren mit dem Titer von 1:80 und 1:160 im MIF-Test wurden richtig erkannt (100%).

Tab. 14 und Abb. 14 stellen die Ergebnisse dar.

**Tab. 14: Vergleich von MIF-Test und Medac-Test für IgM bei verschiedenen Titern**

Titer	MIF-Test	Medac-Test	nicht richtig erkannt
negativ	33	29 87,7%	4 (FP)
1:20	17	8 47,0%	9 (FP)
1:40	14	14 100,0%	0
1:80	4	4 100%	0
1:160	4	4 100%	0

**Abb. 14: Vergleich von MIF-Test (schraffierte Balken) und Medac-Test (nicht schraffierte Balken) für IgM bei verschiedenen Titern**

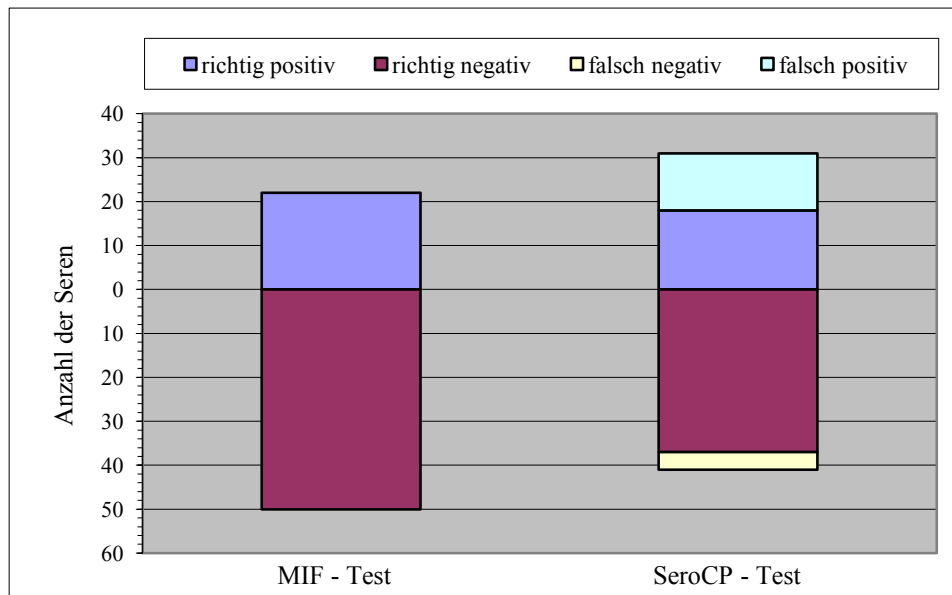
Der Medac-Test erkannte die antikörperfreien Seren zu fast 88% richtig. Beim Titer von 1:20 war die richtige Erkennung der Seren am geringsten und betrug nur 47%. In allen nachfolgenden Titern wurden alle Seren richtig bewertet. Das Nachvollziehen der Ergebnisse des MIF-Tests gelingt mit dem Medac-Test also gut.

### 6. 2. 2 „SeroCP® IgM“-Test

Im diesem Test gab es, verglichen mit dem MIF-Test, 31 positive Seren, 18 richtig und 13 falsch positive. 41 Seren waren negativ, davon 37 richtig und 4 falsch negativ. Tab. 15 und Abb. 15 zeigen die Ergebnisse.

**Tab. 15: Vergleich der IgM-Gesamtergebnisse von MIF-Test und SeroCP-Test**

		MIF-Test		Summe
		positiv	negativ	
SeroCP-Test	positiv	18	13	31
	negativ	4	37	41
Summe		22	50	72



**Abb. 15: Vergleich der IgM-Gesamtergebnisse von MIF-Test und SeroCP-Test**

Die Sensitivität des SeroCP-Tests beträgt 81,8%; 95%-Konfidenzintervall (59,7%; 94,8%), die Spezifität 74%; 95%-Konfidenzintervall (59,6%; 85,3%).

Der SeroCP-Test liefert relativ gute Ergebnisse bei der Erkennung der MIF-positiven Seren, die Sensitivität beträgt über 80%. Die Spezifität ist geringer, denn es werden einige eigentlich negative Seren positiv gewertet. Insgesamt gelingt die richtige Bewertung der Seren durch den SeroCP-Test relativ gut.

Der positive prädiktive Wert des SeroCP-Tests liegt bei  $0,58 = 58\%$  und der negative prädiktive Wert bei  $0,902 = 90,2\%$ . Ein positiv gewertetes Serum ist mit einer Wahrscheinlichkeit von  $58\%$  tatsächlich positiv, ein negativ gewertetes Serum mit einer Wahrscheinlichkeit von  $90,2\%$  wirklich negativ.

Bei der Differenzierung der Ergebnisse in die einzelnen Titer ergaben sich folgende Werte: 26 (78,7%) der 33 im MIF-Test negativ bewerteten Seren wurden ebenfalls negativ bewertet, 7 Seren fälschlich positiv eingestuft.

Beim Titer von 1:20 (17 Seren im MIF-Test) wurden 11 Seren (64,7%) richtig als negativ erkannt, 6 wurden falsch positiv bewertet.

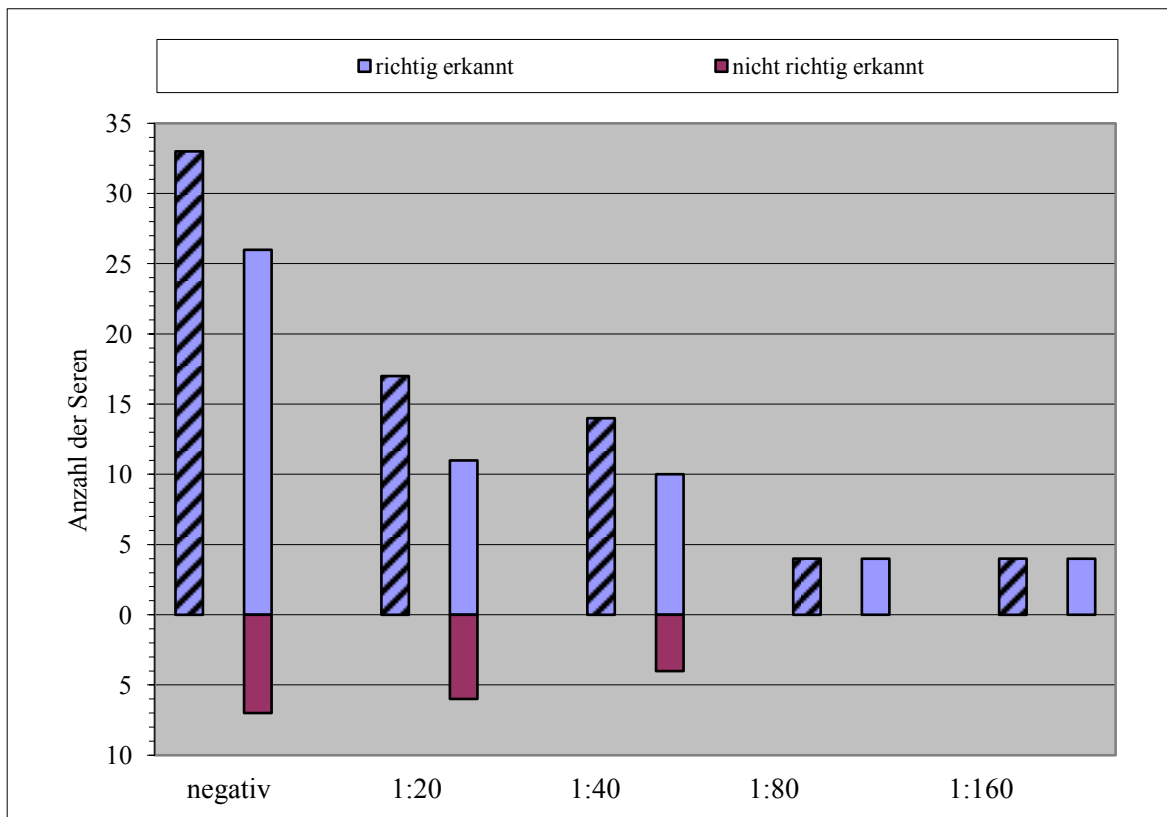
Beim Titer von 1:40 (14 Seren im MIF-Test) wurden 10 Seren (71,4%) richtig positiv erkannt, 4 wurden fälschlicherweise negativ bewertet.

Die jeweils 4 Seren mit dem Titer von 1:80 und 1:160 im MIF-Test wurden richtig positiv erkannt (100%).

Tab. 16 und Abb. 16 zeigen die Ergebnisse.

**Tab. 16: Vergleich von MIF-Test und SeroCP-Test für IgM bei verschiedenen Titern**

Titer	MIF-Test	SeroCP-Test	nicht richtig erkannt
negativ	33	26 78,7%	7 (FP)
1:20	17	11 64,7%	6 (FP)
1:40	14	10 71,4%	4 (FN)
1:80	4	4 100%	0
1:160	4	4 100%	0



**Abb. 16: Vergleich von MIF-Test (schraffierte Balken) und SeroCP-Test (nicht schraffierte Balken) für IgM bei verschiedenen Titern**

Bei den niedrigen Titern gelingt mit dem SeroCP-Test das richtige Bewerten der Seren relativ gut, es werden immer mindestens 64% richtig erkannt. In den höheren Titern wurden alle Seren richtig erkannt. Der SeroCP-Test vollzieht die Ergebnisse des MIF-Tests relativ gut nach.

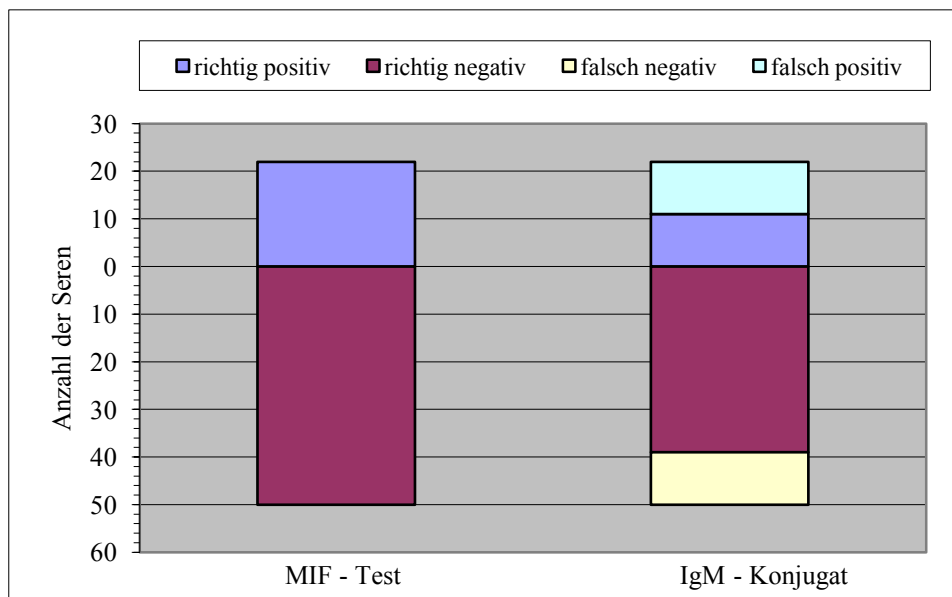


### 6. 2. 3 IgM-Testmaterial der Firma Virion/Serion

Mit dem IgM-Testkonjugat von Virion/Serion gab es im Vergleich zum MIF-Test 22 positive Seren, 11 richtig positive und 11 falsch positive. 50 Seren wurden negativ bewertet, davon 39 richtig und 11 falsch negativ. Tab. 17 und Abb. 17 zeigen die Ergebnisse.

**Tab. 17: Vergleich der IgM-Gesamtergebnisse von MIF-Test und IgM-Testkonjugat**

		MIF-Test		Summe
		positiv	negativ	
IgM-Konjugat	positiv	11	11	22
	negativ	11	39	50
Summe		22	50	72



**Abb. 17: Vergleich der IgM-Gesamtergebnisse von MIF-Test und IgM-Testkonjugat**

Die Sensitivität des Testkonjugates von Virion/Serion beträgt 50%; 95%-Konfidenzintervall (28,2%; 71,7%), die Spezifität 78%; 95%-Konfidenzintervall (64%; 88,4%).

Das Testkonjugat von Virion/Serion erweist sich beim Herausfiltern von positiven Seren als mangelhaft, denn nur 50% der positiven Seren werden als solche erkannt. Das zeigt der Wert der Sensitivität. Die Spezifität liegt bei 78%.

Für das IgM-Testkonjugat beträgt der positive prädiktive Wert  $0,5 = 50\%$  und der negative prädiktive Wert  $0,78 = 78\%$ . Die Wahrscheinlichkeit, daß ein positiv gewertetes Serum tatsächlich positiv ist, beträgt  $50\%$ . Ein negativ gewertetes Serum ist mit einer Wahrscheinlichkeit von  $78\%$  wirklich negativ.

Differenziert man die Ergebnisse in die einzelnen Titer, ergeben sich folgende Werte:

27 (81,8%) der 33 im MIF-Test negativ bestimmten Seren wurden ebenfalls negativ bewertet, 6 Seren waren falsch positiv.

Beim Titer von 1:20 wurden 12 (70,5%) Seren negativ gewertet, 5 waren falsch positiv.

6 (42,8%) Seren wurden beim Titer von 1:40 als positiv erkannt, 8 Seren blieben falsch negativ.

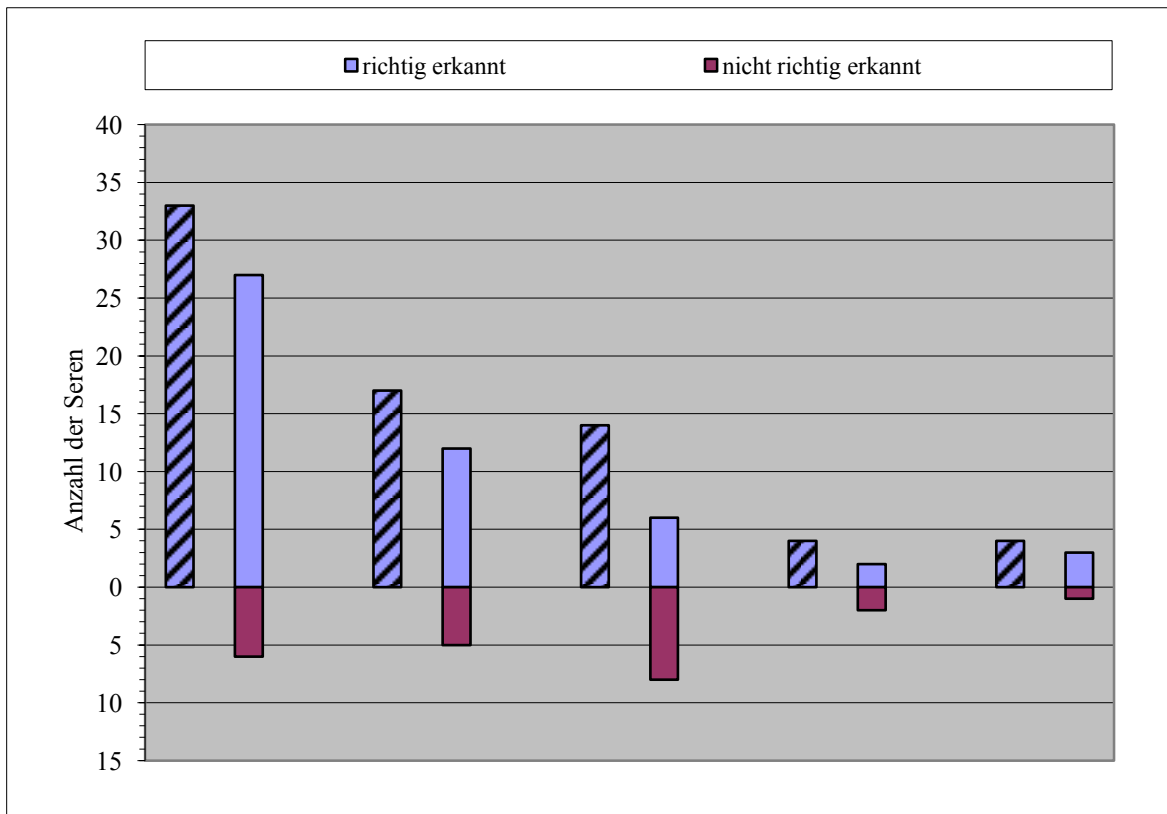
Einen Titer von 1:80 wiesen im MIF-Test 4 Seren auf, davon wurden nur 2 (50%) positiv gewertet, 2 blieben falsch negativ.

Beim Titer von 1:160 waren nur 3 (75%) Seren positiv, eins wurde falsch negativ bewertet.

Tab. 18 und Abb. 18 stellen die Ergebnisse dar.

**Tab. 18: Vergleich von MIF-Test und IgM-Konjugat bei verschiedenen Titern**

Titer	MIF-Test	IgM-Konjugat	nicht richtig erkannt
negativ	33	27 81,80%	6 (FP)
1:20	17	12 70,50%	5 (FP)
1:40	14	6 42,80%	8 (FN)
1:80	4	2 50%	2 (FN)
1:160	4	3 75%	1 (FN)



**Abb. 18: Vergleich von MIF-Test (schraffierte Balken) und IgM-Testkonjugat (nicht schraffierte Balken) bei verschiedenen Titern**

Das Testkonjugat erkennt die antikörperfreien Seren und die Seren mit einem Titer von 1:20 noch relativ gut als negativ. Die Erkennungsraten liegen hier bei mindestens 70%. Beim Titer von 1:40 besteht die größte Unzulänglichkeit des Testkonjugates, es werden nur 42,8% der Seren richtig erkannt. Bei den höheren Titern gelingt der Nachweis wieder etwas besser, es werden 50% und zuletzt 75% der Seren richtig eingeordnet.

Das Testkonjugat liefert insgesamt jedoch keine besonders guten Ergebnisse im Vergleich zum MIF-Test.

#### 6. 2. 4 Zusammenfassung

Die Ergebnisse des Nachweises von IgM-Antikörpern gegen *C. pneumoniae* bzw. gegen Chlamydien mit verschiedenen Tests und dem Testkonjugat lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

Der Test von Medac erreicht einen sehr hohen Sensitivitätswert, der bei 100% liegt. Der Test ist empfindlich und findet alle wirklich positiven Seren als solche heraus. Allerdings wird dieses gute Ergebnis begleitet von der falschen Bewertung einiger negativer Seren als positiv. Die Spezifität des Medac-Tests ist mit 74% noch relativ hoch. Der positiv

prädiktive Wert liegt bei 62,8%. Die Wahrscheinlichkeit für ein positiv gewertetes Serum, tatsächlich positiv zu sein, beträgt 62,8%, denn einige negative Seren werden positiv gewertet. Der negativ prädiktive Wert beträgt 100%, ein negativ bestimmtes Serum ist mit großer Wahrscheinlichkeit tatsächlich negativ. Bei der Differenzierung in die einzelnen Titer zeigt sich der Test bei den antikörperfreien Seren und in den unteren Titern mit 47% bzw. bis 88% richtig erkannten Seren mittelmäßig bis relativ zufriedenstellend in der Lage, die Seren richtig zu bewerten. In den höheren Titern werden durch den Medac-Test alle Seren ausnahmslos richtig erkannt, hier vollzieht der Test die Ergebnisse des MIF-Tests gut nach und erscheint zuverlässig.

Der SeroCP-Test von Hain Diagnostika GmbH zeigt mit einer Sensitivität von über 80% eine relativ gute Empfindlichkeit. Es gibt hier aber einige falsch positive Ergebnisse und auch einen kleinen Anteil falsch negativer Seren. Die Spezifität liegt bei 74%. Der positiv prädiktive Wert ist mit 58% mittelmäßig. Die Wahrscheinlichkeit für ein positiv gewertetes Serum, tatsächlich positiv zu sein, beträgt 58%. Der negativ prädiktive Wert mit 90,2% ist ziemlich hoch, es besteht eine relativ hohe Wahrscheinlichkeit, daß ein negativ bewertetes Serum wirklich negativ ist. Im antikörperfreien Bereich und bei den niedrigen Titern ist der Test mittelmäßig bis relativ zuverlässig, zwischen knapp 64% und 79% der Seren werden richtig gewertet. Bei den zwei höchsten Titern ist der Test sehr zuverlässig und erkennt alle positiven Seren als solche. Hier besteht ein gutes Nachvollziehen der Ergebnisse des MIF-Tests.

Das von Virion/Serion zur Bestimmung von IgM-Antikörpern zur Verfügung gestellte Konjugat zeigte mit einer Sensitivität von 50% nur eine geringe Empfindlichkeit. Viele Seren wurden falsch positiv und viele falsch negativ bestimmt. Die Spezifität ist mit 78% relativ hoch. Der positiv prädiktive Wert beträgt 50%, ein positiv erkanntes Serum hat eine Wahrscheinlichkeit von 50%, wirklich positiv zu sein. Die Wahrscheinlichkeit für ein negativ erkanntes Serum, wirklich negativ zu sein, liegt entsprechend dem negativ prädiktiven Wert bei 78%. In den Seren mit niedrigen Titern erkennt das Konjugat 70,5% bis 81,6% der Seren richtig. In den Seren mit höheren Titern wird maximal die Hälfte der Seren richtig bewertet, nur beim höchsten Titer wertet der Test 75% der positiven Seren als solche.

Es ist bei diesen Betrachtungen zu beachten, daß generell nur eine geringe Serenzahl (72 Seren, 22 davon positiv) vorlag und es dementsprechend vor allem in den höheren Titern nur wenige Seren gab (14 für 1:40, je 4 für 1:80 und 1:160).

## 7. DISKUSSION

Pneumonien sind weltweit eine ernsthafte Bedrohung für die Gesundheit. Sie stellen ein enormes sozio-ökonomisches Problem für die Gesundheitssysteme dar. Laut Angaben der WHO versterben durch Pneumonien zirka drei bis vier Millionen Menschen jährlich, womit die Pneumonie bei den Infektionskrankheiten in der Todesursachenstatistik weltweit an dritter Stelle steht (Lopez und Murray 1998).

Von einer ambulant erworbenen Pneumonie wird dann gesprochen, wenn der auslösende Erreger außerhalb des Krankenhauses aufgenommen wurde (Woodhead und Torres 1997). Die ambulant erworbene Pneumonie (Community Aquired Pneumonia oder CAP) ist auch in Deutschland eine Erkrankung mit hoher Morbidität und Mortalität (Welte et al. 2003). Nach Angaben des Statistischen Bundesamtes mußten zum Beispiel im Jahr 1998 240000 Patienten wegen einer ambulant erworbenen Pneumonie in ein Krankenhaus aufgenommen werden. Damit führt sie häufiger zur stationären Aufnahme als die bekannten „Volkskrankheiten“ Myokardinfarkt und Schlaganfall. Erfahrungsgemäß muß jeder vierte bis fünfte Patient mit ambulant erworbener Pneumonie stationär behandelt werden. Somit kann in Deutschland von zirka 8 Millionen Patienten pro Jahr mit dieser Diagnose ausgegangen werden. Wenngleich die Pneumoniemortalität zurückgegangen ist, liegt sie immer noch bei 6 bis 8% und ist damit die sechsthäufigste Todesursache in Deutschland (Welte et al. 2003).

*C. pneumoniae* als Erreger respiratorischer Infektionen ist erst seit etwa zwei Jahrzehnten als eine neue Chlamydienspezies anerkannt. Während der letzten Jahrzehnte rückten die Chlamydien als Erreger und Kofaktoren verschiedener Infektionskrankheiten vermehrt in den Blickpunkt des Interesses. Sie gelten weltweit als bedeutende Verursacher der ambulant erworbenen Pneumonie. Beispielsweise wird *C. pneumoniae* in epidemiologischen Studien mit 5 bis 15% als deren Ursache bzw. als ursächlich bei allen erfaßten Pneumoniefällen geschätzt (File und Tan 2000, Welte et al. 2003). Außerdem ist zu beachten, daß die Chlamydien in den letzten Jahren im Erregerspektrum (neben anderen atypischen Mikroorganismen) zunehmen.

Sowohl die systematische Stellung verschiedener Gruppen der Chlamydien als auch die Nachweismethoden befinden sich im Prozeß der Neuentwicklung und Neubewertung. Mit den gewonnenen differenzierteren Kenntnissen über die Pathologie und die unterschiedlichen Wirkungen der einzelnen Gruppen ergeben sich auch neue Anforderungen an die Chlamydiendiagnostik.

Für die Therapie einer Infektion mit diesen Erregern ist die zuverlässige Diagnostik eine entscheidende Grundlage und besitzt eine große Wichtigkeit, weil das „Übersehen“ einer Chlamydieninfektion schwerwiegende Folgen haben kann. Die Diagnostik der Pneumonie durch *C. pneumoniae* stellt nach wie vor eine große Herausforderung dar. So betrifft das derzeitige Hauptproblem und der Schwerpunkt der Chlamydienforschung die Diagnostik dieser intrazellulären Erreger (Burkhardt et al. 2003, Dowell et al. 2001).

Generell existieren verschiedene Möglichkeiten des Nachweises, die praktiziert werden können. Die Diagnostik der Chlamydieninfektionen basiert auf dem direkten Erreger-, Antigen- oder Nukleinsäurenachweis und der Serologie. Die Anzucht von *C. pneumoniae* aus respiratorischem Material (Kultur) hat sich als schwierig erwiesen. Die Chlamydien lassen sich nur in speziellen Zellkulturen anzüchten. Diese Methode ist zeitaufwendig, bestimmten Speziallaboren vorbehalten und außerdem in nur wenigen Fällen erfolgreich. Aus diesen Gründen spielt der kulturelle Nachweis in der Routinediagnostik und besonders für die Akutdiagnose der Chlamydien-Pneumonie keine bzw. nur eine untergeordnete Rolle (Burkhardt et al. 2003, Tuschy und Lorenz 2004, Verkooyen et al. 1998). Die Methode der direkten Immunfluoreszenz in Form eines Antigen-Tests, der für die Antigen-Detektion *C. pneumoniae*-spezifische und FITC-markierte Antikörper verwendet, wird aufgrund ihrer geringen Sensitivität und Spezifität nur selten eingesetzt (Burkhardt et al. 2003). Eine kommerzielle, standardisierte Polymerasekettenreaktion steht noch nicht zur Verfügung (Grayston et al. 1993, Hammerschlag 1998, Verkooyen et al. 1998). Aufgrund der Unzulänglichkeiten von kulturellem Erregernachweis und nicht kulturellem Antigennachweis zur Diagnose von *C. pneumoniae*-Infektionen wird die Serologie mit dem Antikörpernachweis als Methode der Wahl angesehen (Barnes 1989, Boman et al. 1997, Dowell et al. 2001, Grayston et al. 1993, Kuo et al. 1995, Schachter et al. 1999). Somit wird die überwiegende Anzahl der *C. pneumoniae*-Pneumonien serologisch – und damit retrospektiv – diagnostiziert (Tuschy und Lorenz 2004).

Für den serologischen Nachweis stehen verschiedene Testverfahren zur Verfügung: Komplementbindungsreaktion, Immunfluoreszenz-Assay (IFA), EIA, ELISA und Immunoblot. Hierbei werden genusspezifische von speziesspezifischen Tests unterschieden, abhängig davon, welches Antigen der Chlamydien für die Suche nach Antikörpern eingesetzt wird (Burkhardt et al. 2003).

Die Komplementbindungsreaktion ist ein veraltetes und technisch anspruchsvolles Verfahren, sie unterscheidet nicht zwischen den einzelnen Chlamydienspezies, weshalb sie keine Rolle unter den serologischen Methoden zum Nachweis von Chlamydienantikörpern

spielt. Die für Chlamydien spezifischen, aber nicht standardisierten Immunoblot-Verfahren können bisher aufgrund ihrer Komplexität im methodischen Bereich nur in Speziallaboren eingesetzt werden (Burkhardt et al. 2003).

Die Indirekten Immunfluoreszenz-Assays sind in Form der Assays, die komplette Einschlußkörperchen infizierter Zellen verwenden, ebenfalls veraltet und spielen für die Diagnostik der *C. pneumoniae*-Pneumonie wegen der nicht bestehenden Möglichkeit eines speziesspezifischen Nachweises keine Rolle mehr, während die andere IFA-Methode, der Mikroimmunfluoreszenz-Test, eine herausragende Rolle spielt (Burkhardt et al. 2003). Er gilt unter den serologischen Methoden als „Goldstandard“ bzw. Methode der Wahl (Dowell et al. 2001, Hermann et al. 2002, Peeling und Brunham 1996, Verkooyen et al. 1997). Er stellt ein ausreichend sensitives Verfahren zur Diagnose von Infektionen durch *C. pneumoniae* dar (Russell 1999, Saikku 1998), zeichnet sich durch die höchste Spezifität beim Nachweis von Antikörpern gegen den Erreger aus und vermag Infektionen mit Chlamydien speziesspezifisch zu erkennen. Als Antigen dienen gereinigte formalinfixierte Elementarkörperchen, an die nach Entfernung gattungsspezifischer Antigene speziesspezifische Antikörper gegen Chlamydien binden können. Der MIF-Test ist für die Diagnostik und für seroepidemiologische Studien von *C. pneumoniae*-Infektionen gut geeignet (Burkhardt et al. 2003, Grayston et al. 1993). Diese Eigenschaften machen das Verfahren zum Referenztest. Der MIF-Test ist jedoch ein aufwendiges, zeit- und kostenintensives Nachweisverfahren, das nicht von jedem Labor durchgeführt wird. Er ist ein subjektiv auszuwertender Test und erfordert dabei ein hohes Maß an Erfahrung. Die Methode ist nicht standardisiert. Viele Labore führen den MIF-Test in einer „in-house“-Technik durch, was erklärt, daß verschiedene Antigenpräparationen und unterschiedliche Cut-off-Kriterien für abgelaufene, kürzlich erfolgte oder akute Infektionen vorliegen, die zu signifikanten Unterschieden in den Ergebnissen von Labor zu Labor führen können. Es muß demzufolge erwähnt werden, daß es keinen „Standard“-MIF-Test gibt (Tuuminen et al. 2000). In einer Studie untersuchten Peeling et al. die Variabilität der MIF-Teste zwischen verschiedenen Laboren (Peeling et al. 2000). Die Variabilität der Ergebnisse ergibt sich nach dieser Studie aus den unterschiedlichen Bedingungen bei der Testdurchführung, wie zum Beispiel der Inkubationszeit für Serumprobe und Konjugat, der Qualität des Konjugates, der Methode, die für die Präparation, Reinigung und Fixation des Antigens genutzt wird, der Stabilität und Dichte des „Antigenpunktes“, der Qualität des Mikroskops und den Fähigkeiten und der Erfahrung des Untersuchers.



Diese verschiedenen Eigenschaften des MIF-Tests sowie der Mangel an anderen diagnostischen Methoden, welche die Ansprüche an Sensitivität, Spezifität und Kosteneffizienz befriedigen (Barnes 1989), können für die Erklärung herangezogen werden, warum weiterhin nach neuen oder anderen serologischen Methoden zum Nachweis von Chlamydien gesucht wird. Bis zur Entwicklung entsprechender Tests bleibt jedoch der MIF-Test der einzige sensitive und spezifische serologische Test zum Chlamydiennachweis (Wardrop 1999), und es sollte jede neue serologische Methode vor ihrer Einführung in die Praxis ihre Sensitivität und Spezifität im Vergleich mit dem MIF-Test nachweisen (Freidank 1994, Persson und Boman 2000). Er ist die einzige akzeptierte Referenzmethode für das Auffinden von speziesspezifischen Antikörpern und bleibt wegen des Fehlens von Alternativen folglich der Goldstandard für die speziesspezifische Chlamydienserologie, besonders dann, wenn standardisierte Antigenpräparationen in Laboratorien verwendet werden, in denen es viel Erfahrung in der Durchführung und mit der Auswertung des Tests gibt. Weil jedoch die Aufbereitung und Verwendung der Antigene für den MIF-Test gewöhnlicherweise in Routinelaboratorien nicht möglich ist, bleibt der Bedarf für einfachere bzw. automatisierbare und standardisierte kommerziell erhältliche Tests, welche die gleichen Informationen wie der MIF-Test gewährleisten, weiterhin bestehen (Freidank et al. 1997, Kuoppa et al. 2002, Kutlin et al. 1997). Es werden dementsprechend immer wieder neue Testmethoden entwickelt und in ihren Eigenschaften überprüft. Zu diesen Testverfahren zählen als serologische Methoden beispielsweise neue MIF-Tests, EIAs oder ELISAs. Die Assays sind im Vergleich zum MIF-Test kostengünstig und in ihrer Auswertung quantitativ, außerdem können sie standardisiert werden. Durch diese Eigenschaften sind die Verfahren einem geringeren subjektiven Einfluß der Untersucher unterlegen und eignen sich besser für die Routinediagnostik des Erregers (Burkhardt et al. 2003). Die ELISA- oder EIA-Verfahren führen den Chlamydiennachweis entweder genus- oder speziesspezifisch, je nach verwendetem Antigen und abhängig von der Antigenpräparation. Viele verschiedene Forschergruppen und Firmen suchen nach sicheren, zuverlässig reproduzierbaren und praktikablen Methoden. Die Ergebnisse der Bewertung neuer Testverfahren und des Vergleiches solcher Testmethoden untereinander bzw. mit anderen Methoden wurden beispielsweise von Hermann et al. (Hermann et al. 2002), Gutierrez et al. (Gutierrez et al. 2002), Bennedsen et al. (Bennedsen et al. 2002), Halvorsen et al. (Halvorsen et al. 2002), Peeling et al. (Peeling et al. 2000), Persson und Boman (Persson und Boman 2000),

Verkooyen et al. (Verkooyen et al. 1997) und Kutlin et al. (Kutlin et al. 1997) veröffentlicht.

Für die Konzeption neuer Testverfahren gibt es unterschiedliche Überlegungen. Eine davon basiert auf epidemiologischen Betrachtungen bzw. der Untersuchung von Häufigkeiten der einzelnen Chlamydienspezies. Die verschiedenen Spezies einer bestimmten Gattung haben unterschiedliche Prävalenzen oder „Durchseuchungsraten“ in der Bevölkerung. Ein genusspezifischer Test erlaubt nun eigentlich nur den Nachweis der betreffenden Gattung (genusspezifischer Nachweis), aber es ist vorstellbar, mit ihm trotzdem eine Aussage zu einer Spezies zu treffen, ausgehend von der hohen Prävalenz der Spezies und im Zusammenhang mit den vorliegenden Symptomen beim Patienten, also der entsprechenden „Klinik“. Es wird gewissermaßen davon ausgegangen, mit der Methode wenigstens einen Teil der Erreger nachweisen zu können. Auch im Falle der Chlamydien wurde diese Überlegung angestellt. Die „Durchseuchung“ der Bevölkerung (Prävalenz) mit *C. pneumoniae* bzw. mit Antikörpern gegen *C. pneumoniae* beträgt bis zu 80%, mit *C. trachomatis* zirka 15% und ist für *C. psittaci* mit zirka 2% nur gering (Darougar 1980, Leinonen 1993, Saikku 2000, Wang und Grayston 1990). Ein neu entwickelter genusspezifischer Test würde prinzipiell Antikörper gegen die Gattung Chlamydien nachweisen können, aber nicht in Antikörper gegen ihre Spezies unterscheiden. Da jedoch die Prävalenz von *C. pneumoniae* in der Bevölkerung sehr hoch ist und weit über den Prävalenzen der anderen Spezies liegt, könnte eine positive Reaktion im Test mit bestimmter hoher Wahrscheinlichkeit auf *C. pneumoniae* zurückzuführen sein, weil die meisten „Chlamydieninfektionen“ durch *C. pneumoniae* verursacht werden. Wenn also ein genusspezifischer Test verwendet wird, dann sollten damit – so zumindest die theoretische Überlegung – auch vorwiegend Antikörper gegen *C. pneumoniae* gefunden werden. Im Zusammenhang mit den „passenden“ Symptomen der respiratorischen Infektion könnte man dann ableiten, daß *C. pneumoniae* der wahrscheinliche Erreger ist. Entsprechende Überlegungen stellte Verkooyen (Verkooyen et al. 1997) an. Er berichtete, ein bestimmter ELISA (von der Medac GmbH, „recombinante DNA-LPS-ELISA“) könne zur Diagnostik einer akuten Infektion durch *C. pneumoniae* trotz seiner Genusspezifität eingesetzt werden. Dies wäre durch die Differenz in der Prävalenz der Infektionen durch die drei Chlamydienspezies *C. pneumoniae*, *C. trachomatis* und *C. psittaci* gerechtfertigt. Infektionen durch *C. pneumoniae* lägen wesentlich häufiger vor als solche, die von *C. trachomatis* und *C. psittaci* hervorgerufen würden (Verkooyen et al. 1997).

Ausgehend von ähnlichen Überlegungen entwickelte die Firma Virion/Serion als Anbieter kommerzieller Tests einen genusspezifischen Test auf der Grundlage der ELISA-Technik, der zum Nachweis von Antikörpern gegen Chlamydien bei respiratorischen Infektionen eingesetzt werden sollte. ELISAs sind einfach, preisgünstig und für große Mengen an Proben geeignet (Boman et al. 1997, Ladany et al. 1989). Weitere Vorteile von ELISAs gegenüber dem MIF-Test bestehen in ihren kurzen „Arbeitszeiten“ und dem objektiven Ablesen der Ergebnisse sowie ihrer Reproduzierbarkeit und Automatisierbarkeit (Kutlin et al. 1997).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Test von Virion/Serion untersucht. Seine Ergebnisse wurden mit den Ergebnissen des MIF-Tests verglichen. Hierbei konnte gezeigt werden, daß die angestellte theoretische Überlegung bezüglich des Antikörpernachweises gegen Chlamydien bei respiratorischen Infektionen mit dem Test von Virion/Serion nicht bestätigt werden konnte. Der Test überzeugte in seinen Ergebnissen beim direkten Vergleich mit dem MIF-Test nicht, so daß er in der vorliegenden Form nicht für einen Praxiseinsatz empfohlen wird. Die entscheidende Überlegung beim Konzipieren des Tests basierte auf dem damals bekannten Wissen über die Chlamydien, die sehr viel stärkere durchgesetzte Differenzierung dieser Erreger erfolgte erst später. So konnte dem bei der Testentwicklung nicht Rechnung getragen werden, die neueren Erkenntnisse über die Chlamydien und ihre Spezies fehlten. Die eigentlich berechnete Überlegung von Virion/Serion bezüglich der Prävalenz der Erreger und die darauf basierenden Überlegungen beim Testaufbau erwiesen sich nun als nicht mehr ausreichend für eine zuverlässige Diagnostik.

In allen drei untersuchten Diagnosegruppen erreichte der Test von Virion/Serion bei der Suche nach IgG-Antikörpern und beim Auffinden von IgA-Antikörpern unbefriedigende Werte im Vergleich zum MIF-Test.

Bis auf wenige Ausnahmen hat der Virion/Serion-Test eine geringe Sensitivität. Dies zeigt die mangelhafte Empfindlichkeit des Tests, positive Seren werden nur unzuverlässig als solche erkannt. Definitionsgemäß soll die Sensitivität bei Suchtests stets hoch sein. Dies ist erforderlich, weil man mit diesen Testverfahren in einer bestimmten Personengruppe möglichst alle Erkrankten finden möchte, ohne Erkrankte zu übersehen. Findet ein Suchtest erkrankte Personen nicht, könnte das unter Umständen fatale Folgen haben. Bei dem vorliegenden Test von Virion/Serion kann nicht davon ausgegangen werden, daß jedes Serum, welches Antikörper gegen Chlamydien in klinisch relevanter Konzentration

enthält, erkannt wird. Der Test zeigt nur eine unzureichende Wahrscheinlichkeit, beim Vorliegen einer Infektion bzw. von Antikörpern auch wirklich anzusprechen. Dadurch wäre es möglich, daß Infektionen durch Chlamydien, insbesondere bei respiratorischen Infektionen, „übersehen“ und nicht diagnostiziert werden. Eine zuverlässige und sichere Diagnostik ist aber die Voraussetzung für eine effektive Therapie. Diesen Anforderungen an die Diagnostik wird der Test von Virion/Serion mit seiner geringen Sensitivität nicht gerecht.

Für die Spezifität des Tests von Virion/Serion ergaben sich relativ hohe Werte. Eine hohe Spezifität bedeutet, es besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, daß ein Gesunder, nicht Infizierter, auch im Test negativ gewertet wird. Im vorliegenden Fall heißt das, dieser Test erkennt negative Seren relativ zuverlässig. Er zeigt hohe Werte für seine Eindeutigkeit. Wertet dieser Test ein Serum als negativ, ist es ziemlich wahrscheinlich, daß tatsächlich keine klinisch relevante Infektion vorliegt. Das allerdings ist für einen Suchtest wesentlich weniger wichtig als für einen Bestätigungstest. Der Test ist von Virion/Serion aber als Suchtest konzipiert worden.

Der positiv prädiktive Wert des Tests von Virion/Serion ist gering. Positiv bestimmte Seren sind nur mit kleiner Wahrscheinlichkeit tatsächlich positiv. Der negativ prädiktive Wert ist relativ hoch, das bedeutet, für Seren, die negativ gewertet wurden, besteht eine relativ hohe Wahrscheinlichkeit, wirklich negativ zu sein.

Seren mit niedrigen Titern werden relativ zuverlässig richtig erkannt bzw. bewertet. Hier stimmen die Ergebnisse meist relativ gut mit denen des MIF-Tests überein. Bei den Seren mit höheren Titern besteht bis auf wenige Ausnahmen nur eine geringe Übereinstimmung mit den Ergebnissen des MIF-Tests. Gerade aber bei diesen höheren Titern ist die richtige Erkennung positiver Seren äußerst wichtig. Die Nichterkennung einer antikörpertragenden oder erkrankten Person (falsch negatives Ergebnis) hat in der Regel schwerwiegendere Konsequenzen als die fälschliche Vermutung, eine gesunde Person sei erkrankt (falsch positives Ergebnis).

Die Vorgabe des MIF-Tests als Referenztest wird vom Test von Virion/Serion insgesamt nicht erreicht. Eine Markteinführung dieses Tests ist aufgrund der vielen nicht erkannten Antikörperträger nicht zu empfehlen. Dies läßt auch den Aspekt der unterschiedlichen Prävalenzen als Voraussetzung für die Entwicklung eines genusspezifischen Tests in den Hintergrund treten. Würde ein solcher genusspezifischer Test für alle darin eingeschlossenen Spezies gleich hohe Sensitivitäten und Spezifitäten aufweisen, könnte man darüber nachdenken, ihn für gewisse Fragestellungen anzuwenden. Die höchste

Priorität muß in diesem Fall jedoch die sichere Zuverlässigkeit beim Erregernachweis haben.

Das schlechte Abschneiden des Virion/Serion-Tests könnte in einer Grundvoraussetzung des Testaufbaues liegen. Die Firma verwendet Elementarkörperchen von *C. psittaci* als Antigen für die Suche nach Antikörpern gegen Chlamydien. Dadurch ist der Test genusspezifisch, und seine Güte hängt von der Stärke der Kreuzreaktivität zwischen den Chlamydienarten ab. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, wie ungeeignet der Test in diesem Fall für die Diagnostik von Chlamydieninfektionen ist und daß mit ihm die theoretische Überlegung bezüglich des Nachweises einer bestimmten Chlamydienspezies aufgrund ihrer hohen Prävalenz mit einem genuspezifischen Test nicht zum Erfolg führen konnte. Wegen der hohen Prävalenz von Antikörpern gegen *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* bei gesunden Erwachsenen müssen Screeningteste zur Bestimmung der Seroprävalenzen von Chlamydien unterscheiden können zwischen *C. trachomatis* und *C. pneumoniae*. Diese Forderung erfüllt bislang in höchstem Maße nur der MIF-Test, der zwischen Antikörpern gegen *C. pneumoniae* und *C. trachomatis* und verschiedenen Immunglobulin-Klassen differenziert (Ladany et al. 1989).

Auch nicht der SeroCP-Test von Hain Diagnostika GmbH, der aufgereinigte, aber immer noch ganze Elementarkörperchen von *C. pneumoniae* als Antigen verwendet und damit als speziesspezifischer Test vorliegt, führt zu voll befriedigenden Ergebnissen. Dies wurde beim Nachweis von IgM-Antikörpern im zweiten Teil der Arbeit gezeigt. Dieser Test hat mit einer Sensitivität von über 80% eine relativ gute Empfindlichkeit. Es gibt einige falsch positive Ergebnisse und auch einen kleinen Anteil falsch negativer Seren bei den Seren mit niedrigeren Titern. Es könnten dadurch einige Seren von Patienten mit einer Infektion durch *C. pneumoniae* übersehen und nicht diagnostiziert werden. Bei den antikörperfreien Seren und bei Seren mit niedrigen Titern ist der Test moderat bis relativ zuverlässig, zwischen knapp 64% und 79% der Seren werden richtig bewertet. In den zwei höchsten Titerstufen ist der Test sehr zuverlässig und erkennt alle positiven Seren, es besteht eine gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen des MIF-Tests. Daß gerade die hochtitrigen Seren zuverlässig erkannt werden, ist eine positive Eigenschaft des Tests.

Mit einer Spezifität von 74% hat der Test einen relativ hohen Wert für seine Eindeutigkeit erreicht. Der positiv prädiktive Wert ist niedrig. Die Wahrscheinlichkeit für ein positiv gewertetes Serum, tatsächlich positiv zu sein, beträgt nur 58%. Der negativ prädiktive Wert mit 90% ist ziemlich hoch. Es besteht eine relativ hohe Wahrscheinlichkeit, daß ein

negativ bewertetes Serum wirklich negativ ist. Aufgrund der nicht ganz befriedigend hohen Sensitivität müssen auch die Ergebnisse des SeroCP-Tests im Zweifelsfall mit dem MIF-Test nachkontrolliert werden.

Die besten Ergebnisse beim Nachweis von Antikörpern gegen *C. pneumoniae* lieferte der Test von Medac, der mit hochaufgereinigten und spezifischen Antigenen von *C. pneumoniae* arbeitet. Er erreicht einen sehr hohen Sensitivitätswert von 100%. Der Test ist sehr empfindlich und findet alle positiven Seren sicher heraus. Allerdings werden auch einige negative Seren als positiv gewertet (falsch positive Seren). Die Spezifität des Medac-Tests ist mit 74% noch relativ hoch. Der positiv prädiktive Wert liegt bei nur 62,8%. Die Wahrscheinlichkeit für ein positiv bestimmtes Serum, tatsächlich positiv zu sein, beträgt deshalb nur 62,8%. Dieser niedrige Wert kommt dadurch zustande, daß einige negative Seren fälschlicherweise positiv gewertet wurden. Der negativ prädiktive Wert beträgt 100%, ein negativ bestimmtes Serum ist folglich mit großer Wahrscheinlichkeit tatsächlich negativ. Bei der Differenzierung in die einzelnen Titer zeigt sich der Test im Bereich der antikörperfreien Seren und bei den Seren mit niedrigen Titern mit 47% bzw. bis 88% richtig erkannten Seren mittelmäßig bis relativ zuverlässig. Bei den höheren Titern werden durch den Medac-Test alle Seren ausnahmslos richtig erkannt, es besteht Übereinstimmung mit den Ergebnissen des MIF-Tests und eine gute Zuverlässigkeit des Medac-Tests. Bei der Differenzierung in die verschiedenen Titer zeigt sich klar die Stärke des Medac-Tests: Die negativen Seren werden nicht ganz so zuverlässig erkannt, aber alle Seren mit höheren Titern werden in voller Übereinstimmung mit dem MIF-Test nachgewiesen. Dies verdient besondere Beachtung, da es bei der Diagnostik von Infektionen wichtig ist, gerade die „positiven Fälle“ aufzufinden. Es hat in der Regel wesentlich schwerwiegendere Konsequenzen, wenn eine Infektion „übersehen“, ein positives Serum also nicht erkannt wird, und einem Patienten aus diesem Grund eine Therapie versagt bleibt, als wenn ein eigentlich negatives Serum als positiv eingestuft und ein Patient dann eventuell entsprechend therapiert wird. Unter diesen Gesichtspunkten läßt sich sagen, daß der Medac-Test Eigenschaften besitzt, die ihn als Suchtest für IgM-Antikörper gegen *C. pneumoniae* geeignet erscheinen lassen. Außerdem läßt sich dieser Test gut durchführen, liefert in relativ kurzer Zeit Ergebnisse und wäre auch in kleineren Einrichtungen gut einsetzbar.

Im Vergleich zu den beiden vorigen (artspezifischen) Tests schneidet das (genusspezifische) Konjugat von Virion/Serion zur Bestimmung von IgM-Antikörpern gegen Chlamydien schlecht ab. Es zeigte mit einer Sensitivität von 50% nur eine geringe Empfindlichkeit. Viele Seren wurden falsch positiv und viele falsch negativ bestimmt. Die Spezifität ist mit 78% relativ hoch. Der positiv prädiktive Wert beträgt 50%. Ein positiv erkanntes Serum hat eine Wahrscheinlichkeit von 50%, wirklich positiv zu sein, während die Wahrscheinlichkeit für ein negativ erkanntes Serum, wirklich negativ zu sein, entsprechend dem negativ prädiktiven Wert bei 78% liegt. Bei den Seren mit niedrigen Titern zeigt sich das Konjugat noch relativ zuverlässig im Vergleich zu den Ergebnissen des MIF-Tests. 70,5% bis 81,6% der Seren werden richtig erkannt. Bei den höheren Titern ist das Konjugat unzuverlässiger. Maximal die Hälfte der Seren wird richtig erkannt. Nur bei den Seren mit dem höchsten Titer findet der Test 75% der positiven Seren.

Es ist bei diesen Betrachtungen zu beachten, daß generell nur eine geringe Serenzahl vorlag (72 Seren, nur 22 positiv) und es dementsprechend vor allem in den höheren Titern nur wenige Seren gab (14 Stück mit Titer 1:40, je 4 mit Titer 1:80 und 1:160).

Das stets erweiterte Spektrum von Erkrankungen, die mit *C. pneumoniae* assoziiert wurden, hat zu einer erheblichen Zunahme von neuen Untersuchern und Laboratorien geführt, die in die chlamydienbezogene Forschung eingebunden wurden. Die Testergebnisse sind oft widersprüchlich und schwer zu interpretieren, dramatische Erkenntnisse eines Labors werden von anderen nicht bestätigt (Dowell et al. 2001). Neue Veröffentlichungen auf dem Gebiet sollten aus diesem Grund mit Vorbehalt betrachtet werden.

Die Vielfalt der Befunde könnte jedoch auch eine Folge der Artendiversität im Sinne von Everett et al. (Everett et al. 1999) sein und darauf hindeuten, daß mit unterschiedlichem Material bei der Testherstellung bzw. beim Testaufbau gearbeitet wurde. Bei allen Veröffentlichungen und den daraus eventuell abgeleiteten Schlußfolgerungen ist es folglich von großer Bedeutung, sich genau über die verwendeten Materialien und Vorgehensweisen zu informieren, bevor folgenschwere Aussagen getroffen werden.

Die serologische Chlamydiendiagnostik kann mittlerweile mit einer ganzen Reihe unterschiedlicher Methoden vorgenommen werden. Sie reicht von diversen „in-house“-MIF-Techniken über EIAs zu ELISAs. Beim Testaufbau werden unterschiedliche Wege beschritten. Während in den meisten Fällen mit speziesspezifischem Material gearbeitet wird, entschied sich die Firma Virion/Serion, ihren ELISA „nur“ genusspezifisch

anzulegen. Morre et al. (Morre et al. 2002) weisen jedoch schon darauf hin, daß bei der Anwendung von serologischen Testverfahren, bei welchen Antigene mit genusspezifischen Eigenschaften verwendet werden, mit Kreuzreaktionen durch andere Chlamydien, vor allem *Chlamydia trachomatis*, zu rechnen ist. Bei der Suche nach Antikörpern gegen bestimmte Chlamydienarten könnten serologische Kreuzreaktionen zu hohen Raten falsch positiver Ergebnisse führen, besonders in Populationen mit niedriger Prävalenz von einer Chlamydienart (Morre et al. 2002). Diese Sachverhalte müssen beim Virion/Serion-Test als genusspezifischem Test beachtet werden. Andererseits besteht der Vorteil des Virion/Serion-Tests darin, daß er sich der ELISA-Technik bedient. Damit erweist sich der Test von der Handhabung her als einfacher, recht schnell durchführbarer Test, der auch in kleineren Einrichtungen gut einsetzbar wäre.

Die Firma Virion/Serion sollte ihren Test verbessern. Unter anderem erscheint es empfehlenswert, als Antigen für den Aufbau des Tests nicht wie im vorliegenden Fall Material von *C. psittaci* zu verwenden, sondern auf *C. pneumoniae* zurückzugreifen, da der Test ja für die Diagnostik bei respiratorischen Infektionen – und damit bei Infektionen durch *C. pneumoniae* – eingesetzt und dieser Erreger (indirekt über Antikörpernachweis) schließlich auch nachgewiesen werden soll. Dies sollte generell bei einem Testaufbau gefordert werden: Nur mit Material der Art arbeiten, um die es im Test geht. Schließlich ist bekannt, daß wegen der Präsenz von genusspezifischen Antigenen in den Elementarkörperchen der Chlamydien Kreuzreaktionen durch andere Chlamydienspezies nicht unerwartet auftreten. Nach Ladany et al. (Ladany et al. 1989) kann es beispielsweise zu einer Überschätzung der Seroprävalenz von *C. trachomatis*- Infektionen kommen, wenn in Assays genusspezifische Antigene zur Bestimmung von *C. pneumoniae*-spezifischen Antikörpern verwendet werden. Würden bestimmte genusspezifische Antigenkomponenten von den für einen Test verwendeten Elementarkörperchen der jeweiligen Chlamydienart entfernt, ginge die Kreuzreaktivität zwischen den einzelnen Spezies zurück (Ladany et al. 1989). Es erscheint also wenig sinnvoll, Antigene einer Spezies zu verwenden, die gar nicht nachgewiesen werden soll. Der Virion/Serion-Test führt den Erregernachweis nur genusspezifisch und erkennt daher nur die Gattung der gesuchten Erreger, nicht die einzelnen Spezies. Das ist natürlich bei den Chlamydien, die mehrere Spezies mit unterschiedlicher pathogener Potenz ausbilden, denkbar schlecht. Zur Zeit findet ein Umbruch in der Systematik und Taxonomie der Chlamydien statt, der zu einer viel differenzierteren Aufteilung dieser Gruppe führen wird, als sie bisher bestand (Everett et al. 1999). In dem Maße, wie sich die Chlamydienarten und -gruppen hinsichtlich ihrer



ökologischen, genetischen und pathophysiologischen Eigenheiten differenzieren lassen, werden die Anforderungen an die Diagnostik steigen. Es wird also zu empfindlicheren und spezifischeren Nachweismethoden kommen müssen, die auch in der allgemeinen klinischen Praxis die nötige Zuverlässigkeit zeigen.

Die sich ständig vergrößernde Chlamydien-Diagnostik-Testpalette findet in den letzten Jahren – auch ohne die neueren taxonomischen Vorstellungen schon zu berücksichtigen – in vergleichenden Untersuchungen zunehmende Beachtung. Es können mit unterschiedlichen Ausgangsmaterialien Tests aufgebaut werden, welche die einzelnen Immunglobulinklassen nachweisen. Diese Tests mit ganz unterschiedlichen Versuchsansätzen werden an Seren von Gesunden oder Kranken miteinander verglichen (Kutlin et al. 1997, Persson und Boman 2000). Bei allen unterschiedlichen Testgrundlagen und Ausgangsmaterialien drehen sich die Untersuchungen meist um die Frage, ob einfacher zu handhabende und standardisierbare Tests auf EIA- und ELISA-Basis die aufwendigen, aber hinsichtlich Sensitivität und Spezifität führenden MIF-Tests ergänzen oder ersetzen können. Dabei werden Kriterien wie zu suchende Antikörpertypen, Spezifität der Epitope der Antigene, technischer Aufwand der Testverfahren, Objektivität und Möglichkeiten der Automatisierung mit in Betracht gezogen (Guitierrez et al. 2002). Die Ergebnisse der vergleichenden bzw. evaluierenden Untersuchungen verdeutlichen mehr oder minder, wie wichtig die gezielte Gewinnung der Ausgangsmaterialien für die Testqualität ist. Es zeichnet sich zunehmend die Erkenntnis ab, daß mit den diversen ELISAs oder EIAs bei der sorgfältigen Antigenauswahl durchaus gute Ergebnisse im Vergleich zum MIF-Test erreichbar sind. Guitierrez et al. (Guitierrez et al. 2002) beispielsweise konstatieren eine gute Übereinstimmung des von ihnen untersuchten ELISA und schlußfolgern, daß dieser Test eine Alternative zum MIF-Test sein könnte (Guitierrez et al. 2002). Der von ihnen untersuchte, kommerziell erhältliche Test verwendet ein Protein aus gereinigten Elementarkörperchen als Antigen (sogenanntes COMC-Protein). Kishimoto et al. (Kishimoto et al. 1996) verglichen einen neu entwickelten ELISA mit dem MIF-Test und stellten fest, daß dieser neue Test in ihren Untersuchungen hochspezifisch für *C. pneumoniae* war. Als Antigen für den Testaufbau wurde ebenfalls ein aus Elementarkörperchen von *C. pneumoniae* gewonnenes COMC-Protein verwendet. Es wurden auch Seren von Patienten mit Infektionen durch *C. trachomatis* und *C. psittaci* mit dem neuen Test untersucht, wobei deutlich wurde, daß die Übereinstimmung mit dem MIF-Test bezogen auf den Nachweis von Antikörpern gegen diese zwei Spezies deutlich

unter der Übereinstimmung beim Nachweis von Antikörpern gegen *C. pneumoniae* lag, was seine Speziespezifität unterstrich. Auch Bessho (Bessho 2000) macht einen Vorschlag zur Vorgehensweise beim Testaufbau: Er entwickelte eine bestimmten Methode zum speziespezifischen Chlamydiennachweis, für die er die genusspezifischen Antikörper durch vorherige Adsorption mit heterologem Chlamydienantigen entfernte. Bei der Detektion von speziespezifischen Antikörpern gegen Chlamydien zeigte sich, daß mit dieser Methode die genusspezifischen Antikörper signifikant erniedrigt waren, was vermuten läßt, daß genauere Ergebnisse erzielt werden könnten (Bessho 2000).

Ein weiterer umfangreicher Methodenvergleich wurde von Hermann et al. (Hermann et al. 2002) vorgelegt. Hier wurden elf kommerziell erhältliche Tests zum Nachweis von *C. pneumoniae*-spezifischem IgG an 80 Seren asymptomatischer, gesunder Personen untersucht und beurteilt. Vier verschiedene MIF-Tests dienten als Bezugsgröße für die sieben EIAs und ELISAs, die bis auf eine Ausnahme speziespezifisch ausgelegt waren. Die Korrelationen der Ergebnisse der MIF-Tests untereinander reichte von 83% bis 99%, beim Vergleich der MIF-Tests mit den anderen Tests korrelierten die Ergebnisse im Bereich von 78% bis 98%. Die Sensitivitäten variierten zwischen 58% bis 100%, die Spezifitäten lagen zwischen 95% und 100%. Bei der Bestimmung von IgG-Antikörpertitern trat in den Untersuchungen ein Problem auf: Die mit den vier MIF-Tests gemessenen Titer stimmten in ihren Werten gut überein. Alle untersuchten ELISAs und EIAs waren nur mäßig in der Lage, niedrige Antikörpertiter zu erkennen. Die Autoren folgerten aus ihrem umfangreichen Assayvergleich, daß der MIF-Test immer noch die beste Methode zur Bestimmung von IgG im Serum von Gesunden darstellt, daß die Sensitivitäten und Spezifitäten der neuen Tests sich jedoch den Werten des MIF-Tests annähern. Es wird erwähnt, daß sich die Differenzen bei den kommerziell erhältlichen Tests primär auf die verwendeten Antigene zurückführen lassen (Hermann et al. 2002).

Dies ist ja auch genau der Bereich, in dem die Problematik des Tests von Virion/Serion liegt. Dessen schlechtes diagnostisches Abschneiden im Vergleich zum MIF-Test war rein theoretisch vorherzusehen. Wenn der Test bei der Diagnostik der ambulant erworbenen Pneumonie durch *C. pneumoniae* eingesetzt werden soll, stellt es von vornherein einen Schwachpunkt dar, zum Testaufbau das Antigen einer anderen Chlamydienart, nämlich *C. psittaci*, zu verwenden. Denn dann beschränkt sich die diagnostische Schärfe nur auf die kreuzreagierenden (genusspezifischen) Antigenbereiche. Dies reicht bei einer sich ausweitenden Differenzierung der Chlamydienarten bei weitem nicht mehr aus.

In Auswertung der Ergebnisse läßt sich die im Titel der Arbeit gestellte Frage daher nur mit einem „Nein“ beantworten.

Zusammenfassend muß gesagt werden, daß der evaluierte genusspezifische ELISA der Firma Virion/Serion die nötigen Qualitätskriterien für die kommerzielle Markteinführung nicht erreicht, weil mit ihm keine klaren Ergebnisse zu erzielen sind. Mit einer neuen, verbesserten und auf Speziespezifität ausgerichteten Antigenaufbereitung dürften bessere Resultate zu erreichen sein, denn das methodische Potential der ELISA-Technik stellt dafür eine gute Grundlage dar.

## 8. SCHLUSSFOLGERUNGEN

Der Test von Virion/Serion hat die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführte Evaluierung auf seine Tauglichkeit zur Diagnose der ambulant erworbenen Pneumonie nicht bestanden, da er sich als unzuverlässig bei der Erkennung von Seren mit Antikörpern gegen Chlamydien in klinisch relevanter Konzentration erwiesen hat. Seine Sensitivitätswerte in den verschiedenen Diagnosegruppen sind unbefriedigend, was für einen „Suchtest“ ungünstig ist. Die Spezifitätswerte liegen höher, was aber für einen Suchtest, der möglichst alle Antikörperträger erkennen sollte, weniger wichtig ist. Als genusspezifisch ausgerichteter Test ist der ELISA von Virion/Serion nicht in der Lage, einen Beitrag zur Diagnose der ambulant erworbenen Pneumonie, die durch *C. pneumoniae* hervorgerufen wird, zu leisten. Es liegen zu viele falsch bewertete Seren vor. Mit diesem Test ist kein zuverlässiger Nachweis bzw. keine zuverlässige Diagnostik möglich. Tests anderer Firmen, die mit ELISA-Technik arbeiten, aber genusspezifische Antigene verwenden, schneiden bei der Erkennung von Antikörpern gegen *C. pneumoniae* besser ab.

Eine Empfehlung an die Firma ist, bei der Weiterentwicklung oder Umstrukturierung des Tests ein geeigneteres Antigen auszuwählen. Der Test sollte speziesspezifisch ausgerichtet werden und das gewählte Antigen zum geplanten Einsatzgebiet des Tests sehr gut passen.

## 9. LITERATURVERZEICHNIS

**Aldous MB, Grayston JT, Wang SP, Foy HM.** 1992. Seroepidemiology of *Chlamydia pneumoniae* TWAR infection in Seattle families, 1966 - 1979. The Journal of Infectious Diseases, 166 (3): 646-649.

**Balin BJ, Appelt DM.** 2001. Role of infection in Alzheimer disease. The Journal of the American Osteopathic Association, 12: 1-6.

**Barnes RC.** 1989. Laboratory diagnosis of human Chlamydial infections. Clinical Microbiology Reviews, 2 (2):119-139.

**Bennedsen M, Berthelsen L, Lind I, and the Infection, Atherosclerosis and Macrolide Antibiotics Group.** 2002. Performance of three Microimmunofluorescence assays for detection of *Chlamydia pneumoniae* immunoglobulin M, G and A antibodies. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 9 (4): 833-839.

**Berger L, Volp K, Mathews S, Speare R, Timms P.** 1999. *Chlamydia pneumoniae* in a free-ranging giant barred frog (*Mixophyes iteratus*) from Australia. Journal of Clinical Microbiology, 37 (7): 2378-2380.

**Bergström K, Domeika M, Vaitkiene D, Persson K, Mardh PA.** 1996. Prevalence of *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia pneumoniae* antibodies in blood donors and attendees of STD clinics. Clinical Microbiology and Infection, 1 (4): 253-260.

**Bessho H.** 2000. Detection of Chlamydia species-specific serum antibodies by prior adsorption of common genus-specific antibodies. Immunology and Medical Microbiology, 28 (4): 269-272.

**Blasi F, Cosentini R, Legnani D, Denti F, Allegra L.** 1993. Incidence of community-acquired pneumonia caused by *Chlamydia pneumoniae* in Italian patients. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 12 (9): 696-699.

- Blasi F, Tarsia P, Arosio C, Fagetti L, Allegra L.** 1998. Epidemiology of *Chlamydia pneumoniae*. Clinical Microbiology and Infection, 4, Suppl. 4: 1-6.
- Bodetti TJ, Jacobson E, Wan C, Hafner L, Pospischil A, Rode K, Timms P.** 2002. Molecular evidence to support the expansion of the hostrange of *Chlamydophila pneumoniae* to include reptiles as well as humans, horses, koalas and amphibians. Systematic and applied Microbiology, 25 (1): 146-152.
- Boman J, Allard A, Persson K, Lundborg M, Juto P, Wadell G.** 1997. Rapid diagnosis of respiratory *Chlamydia pneumoniae* infection by nested touchdown Polymerase Chain Reaction compared with culture and antigen detection by EIA. The Journal of Infectious Diseases, 175 (6): 1523-1526.
- Bühl A, Zöfel P.** 2002. SPSS 11, Einführung in die moderne Datenanalyse unter Windows. Achte Aufl.. München: Pearson Studium Verlag.
- Burkhardt O, Straube E, Welte T.** 2003. Klinisches Bild, Diagnostik und Therapie der Chlamydien-Pneumonie. Pneumologie, 57: 449-458.
- Bush RM, Everett KD.** 2001. Molecular evolution of the Chlamydiaceae. International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology, 51: 203-220.
- Campbell LA, Marrazzo JM, Stamm WE, Kuo CC.** 2001. Chlamydiae. In: Cimolai N, Hrsg. Laboratory diagnosis of bacterial infections. New York:Marcel Dekker Verlag, 795-821.
- Campbell LA, Kuo CC.** 2003. *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis. Seminars in Respiratory Infections, 18 (1): 48-54.
- Campbell LA, Kuo CC.** 2004. *Chlamydia pneumoniae* – an infectious risk factor for atherosclerosis? Nature Reviews Microbiology, 2 (1): 23-32.

**Cosentini R, Blasi F, Raccanelli R, Rossi S, Arosio C, Tarsia P, Randazzo A, Allegra L.** 1996. Severe community-acquired pneumonia. A possible role for *Chlamydia pneumoniae*. *Respiration*, 63 (2): 61-65.

**Dalhoff K, Maas M.** 1996. *Chlamydia pneumoniae* pneumonia in hospitalized patients. *Chest*, 110 (2): 351-356.

**Dalhoff K, Kothe H, Maas M, Katus HA.** 2000. Klinische Relevanz der *Chlamydia pneumoniae* Infektion - vom Respirationstrakt bis zum Gefäßsystem. *Pneumologie*, 54 (11): 517-524.

**Dalhoff K.** 2004. Chlamydieninfektionen beim Menschen. *Pneumologie*, 58: 282-284.

**Danesh J, Collins R, Peto R.** 1997. Chronic infections and coronary heart disease. Is there a link? *Lancet*, 350: 430-436.

**Darougar S, Forsey T, Brewerton DA, Rogers KL.** 1980. Prevalence of antichlamydial antibodies in London blood donors. *British Journal of Venereal Diseases*, 56: 404-407.

**Daugharty H, Messmer TO, Fields BS.** 1997. ELISPOT Assay for Chlamydia-specific, antibody-producing cells correlated with conventional Complement Fixation and Microimmunofluorescence. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 11 (1): 45-52.

**Dowell SF, Peeling RW, Boman J, Carlone GM, Fields BS, Guarner J, Hammerschlag MR, Jackson LA, Kuo CC, Maass M, Messmer TO, Talkington DF, Tondella ML, Zaki SR, and the *C. pneumoniae* Workshop Participants.** 2001. Standardizing *Chlamydia pneumoniae* assays: Recommendations from the Centers for Disease Control and Prevention (USA) and the Laboratory Centre for Disease Control (Canada). *Clinical Infectious Diseases*, 33 (4): 492-503.

**Dugan JP, Feuge RR, Burgess DS.** 2002. Review of evidence for a connection between *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerotic disease. *Clinical Therapeutics*, 24 (5): 719-735.

- Ekman MR, Leinonen M, Syrjälä H, Linnanmäki E, Kujala P, Gaikku P.** 1993. Evaluation of serological methods in the diagnosis of *Chlamydia pneumoniae* during an epidemic in Finland. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 12 (10): 756-760.
- Essig A, Nüssele K, Bartmann P, Marre R.** 1993. *Chlamydia pneumoniae* - Eine neue Chlamydienspezies findet Beachtung. *Deutsches Ärzteblatt*, 90 (39): 2592-2596.
- Everett KD, Bush RM, Andersen AA.** 1999. Emended description of the order *Chlamydiales*, proposal of *Parachlamydiaceae* fam. nov. and *Simkaniaceae* fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family *Chlamydiaceae*, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49: 415-440.
- Falsey AR, Walsh EE.** 1993. Transmission of *Chlamydia pneumoniae*. *The Journal of Infectious Diseases*, 168: 493-496.
- File TM, Tan JS.** 2000. *Chlamydia Pneumoniae* Pneumonia. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 21 (4): 285-294.
- Freidank H.** 1992. Akute respiratorische Infektionen durch *Chlamydia pneumoniae*. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 117 (5): 187-191.
- Freidank H.** 1994. Untersuchungen zum Nachweis von *Chlamydia pneumoniae*. *Klin Lab*, 40: 223-227.
- Freidank H, Vögele H, Eckert K.** 1997. Evaluation of a new commercial Microimmunofluorescence Test for detection of antibodies to *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, and *Chlamydia psittaci*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 16 (9): 685-688.
- Fünfstück R.** 1999. Infektionskrankheiten sind ein weltweites Problem. *Klinikmagazin Klinikum der Friedrich-Schiller-Universität Jena*, 3 (29).



**Grayston JT, Kuo CC, Wang SP, Altman J.** 1986. A new *Chlamydia psittaci* strain, TWAR; isolated in acute respiratory tract infections. New England Journal of Medicine, 315: 161-168.

**Grayston JT, Kuo CC, Campbell LA, Wang SP.** 1989. *Chlamydia pneumoniae* sp. nov. for *Chlamydia* sp. strain TWAR. The International Journal of Systematic Bacteriology, 39 (1): 88-90.

**Grayston JT, Wang SP, Kuo CC, Campbell LA.** 1989. Current knowledge on *Chlamydia pneumoniae*, strain TWAR, an important cause of pneumonia and other acute respiratory diseases. European Journal of Microbiology and Infectious Diseases. 8 (3): 191-202.

**Grayston JT, Campbell LA, Kuo CC, Mordhorst CH, Saikku P, Thom DH, Wang SP.** 1990. A new respiratory tract pathogen: *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR. The Journal of Infectious Diseases, 161 (4): 618-625.

**Grayston JT.** 1992. Infections caused by *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR. Clinical Infectious Diseases, 15 (5): 757-763.

**Grayston JT.** 1992. *Chlamydia pneumoniae*, strain TWAR pneumoniae. Annual Review Medicine, 43: 317-323.

**Grayston JT, Aldous MB, Easton A, Wang SP, Kuo CC, Campbell LA, Altmann J.** 1993. Evidence that *Chlamydia pneumoniae* causes pneumonia and bronchitis. The Journal of Infectious Diseases, 168 (5): 1231-5.

**Grayston JT, Gobubjatnikov R, Hagiwara T, Hahn DL, Leinonen M, Persson K, Saikku P, Treharne J, Wang SP, Yamazaki T.** 1993. Serologic tests for *Chlamydia pneumoniae*. The Pediatric Infectious Disease Journal, 12 (9): 790.

**Grayston JT, Campbell LA.** 1999. The role of *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerosis. Clinical Infectious Diseases, 28: 993-994.

**Grayston JT, Wang SP.** 1999. History of *Chlamydia pneumoniae* (TWAR) In: Allegra L, Blasi F, Hrsg. *Chlamydia pneumoniae: the lung and heart*. Milano: Springer Verlag, 1-8.

**Grayston JT.** 2000. Background and current knowledge of *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis. *The Journal of Infectious Diseases*, 181, Suppl. 3: 402-410.

**Gutierrez J, Mendoza J, Fernandez F, Linares-Palomino J, Soto MJ, Maroto MC.** 2002. ELISA test to detect *Chlamydophila pneumoniae* IgG. *Journal of Basic Microbiology*, 42 (1): 13-18.

**Hain Diagnostika GmbH.** 2000. SeroCP IgM Enzym Immunoassay zum Nachweis von spezifischen IgM-Antikörpern gegen *Chlamydia pneumoniae*.

**Halvorsen DS, Borvik T, Njolstad I, Gutteberg TJ, Vorland LH, Hansen JB.** 2002. *Chlamydia pneumoniae* IgA- and IgG antibodies in young survivors of myocardial infarction. A comparison of antibody detection by a microimmunofluorescence test and an enzyme immunoassay. *Journal of Internal Medicine*, 251 (2): 142-147.

**Hermann C, Graf K, Groh A, Straube E, Hartung T.** 2002. Comparison of eleven commercial tests for *Chlamydia pneumoniae*-specific Immunoglobulin G in asymptomatic healthy individuals. *Journal of Clinical Microbiology*, 40 (5): 1603-1609.

**Hammerschlag MR.** 1998. Current knowledge of *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 17: 305-308.

**Hotzel H, Grossmann E, Mutschmann F, Sachse K.** 2001. Genetic characterisation of a *Chlamydophila pneumoniae* isolat from an African frog and comparison to currently accepted biovars. *Systematic and applied Microbiology*, 24 (1): 63-66.

**Iliffe-Lee ER, McClarty G.** 1999. Glucose metabolism in *Chlamydia trachomatis*: The 'energy parasite' hypothesis revisited. *Molecular Microbiology*, 33: 177-187.

**Institut für Medizinische Mikrobiologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena.**

2001. Arbeitsanleitung *Chlamydia pneumoniae/trachomatis/psittaci*. Jena: Institut für Medizinische Mikrobiologie der Friedrich-Schiller-Universität

**Johnston WB, Eidson M, Smith KA, Stobierski MG.** 2000. Compendium of measures to control *Chlamydia psittaci* infection among humans (psittacosis) and pet birds (avian chlamydiosis). MMWR Recommendations and Reports, 49, RR-8: 3-17.

**Kalayoglu MV, Libby P, Byrne GI.** 2002. *Chlamydia pneumoniae* as an emerging risk factor in cardiovascular disease. Journal of the American Medical Association 288 (21): 2724-2731.

**Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, Zinkernagel RM, Hrsg.** 1998. Medizinische Mikrobiologie. Neunte Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 338-343.

**Kishimoto T, Kubota Y, Matsushima T, Izutsu H, Matsumoto A, Soejima R, Morikawa T, Kawagoe K.** 1996. Assay of specific anti-*Chlamydia pneumoniae* antibodies by ELISA method. 1. Evaluation of ELISA kit using outer membrane complex). Kansenshogaku Zasshi, 70 (8): 821-829.

**Kuo CC, Grayston JT, Campbell LA, Goo YA, Wissler RW, Benditt EP.** 1995. *Chlamydia pneumoniae* (TWAR) in coronary arteries of young adults (15 - 35 years old). Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 92: 6911-6914.

**Kuo CC, Jackson L, Campbell LA, Grayston JT.** 1995. *Chlamydia pneumoniae* (TWAR). Clinical Microbiology Reviews, 8 (4): 451-461.

**Kuo CC, Campbell LA.** 1998. Is infection with *Chlamydia pneumoniae* a causative agent in atherosclerosis? Molecular Medicine Today, 4: 426-430.

**Kuoppa Y, Boman J, Scott L, Kumlin U, Eriksson I, Allard A.** 2002. Quantitative detection of respiratory *Chlamydia pneumoniae* infection by real-time PCR. Journal of Clinical Microbiology, 40 (6): 2273-2274.

**Kutlin A, Tsumura N, Emre U, Roblin PM, Hammerschlag MR.** 1997. Evaluation of Chlamydia Immunoglobulin M (IgM), IgG, and IgA rELISAs Medac for diagnosis of *Chlamydia pneumoniae* infection. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 4 (2): 213-216.

**Kutlin A, Flegg C, Stenzel D, Reznik T, Roblin PM, Mathews S, Timms P, Hammerschlag MR.** 2001. Ultrastructural study of *Chlamydia pneumoniae* in a continuous-infection model. Journal of Clinical Microbiology, 39 (10): 3721-3723.

**Ladany S, Black CM, Farshy CE, Ossewaarde JM, Barnes RC.** 1989. Enzyme Immunoassay to determine exposure to *Chlamydia pneumoniae* (strain TWAR). Journal of Clinical Microbiology, 27 (12): 2778-2783.

**Leinonen M.** 1993. Pathogenetic mechanisms and epidemiology of *Chlamydia pneumoniae*. European Heart Journal, 14, Suppl. K: 57-61.

**Leinonen, M.** 1993. *Chlamydia pneumoniae* and its epidemiology. European Heart Journal, 14, Suppl. K: 57-61.

**Lin TM, Kuo CC, Chen WJ, Lin FJH, Eng HL.** 2004. Seroprevalence of *Chlamydia pneumoniae* infection in Taiwan. Journal of Infection, 48: 91-94.

**Linnanmaki E, Leinonen M, Mattila K, Nieminen MS, Valtonen V, Saikku P.** 1993. *Chlamydia pneumoniae*-specific circulating immune complexes in patients with chronic coronary heart disease. Circulation, 87 (4): 1130-1134.

**Lopez AD, Murray CC.** 1998. The global burden of disease. Nature Medicine, 4: 1241-1243.

**Marre R, Hahn H.** 1999. Chlamydien. In: Hahn H, Falke D, Kaufmann SHE, Ullmann U, Hrsg. Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Dritte Aufl. Berlin: Springer Verlag, 441-450.

**Marrie TM, Grayston JT, Wang SP, Kuo CC.** 1987. Pneumonia associated with the TWAR Strain of Chlamydia. *Annals of International Medicine*, 106 (4): 507-511.

**McClarty G.** 1999. In: Stephens RS, Hrsg. Chlamydia: intracellular biology, pathogenesis, and immunity. Washington DC: American Society for Microbiology, 69-100.

**Medac Diagnostika.** Ohne Datumsangabe. *Chlamydia pneumoniae*-IgM-ELISA medac, Enzymimmunoassay zur Bestimmung von IgM-Antikörpern gegen *Chlamydia pneumoniae*, Vorläufige Arbeitsanleitung.

**Miura K, Inouye S, Sakai K, Takaoka H, Kishi F, Tabuchi M, Tanaka T, Matsumoto H, Shirai M, Nakazawa T, Nakazawa A.** 2001. Cloning and characterization of adenylate kinase from *Chlamydia pneumoniae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 276 (16): 13490-13498.

**Moine P, Vercken JB, Chevret S, Chastang C, Gajdos P and the French Study Group for community-acquired pneumonia in the intensive care unit.** 1994. Severe community-acquired pneumonia. Etiology, epidemiology and prognosis factors. *Chest*, 105 (5): 1487-1495.

**Morre SA, Munk C, Persson K, Krüger-Kjaer S, van Dijk R, Meijer CJLM, van den Brule AJC.** 2002. Comparison of three commercially available peptid-based immunofluorescence assay for detection of *Chlamydia trachomatis* antibodies. *Journal of Clinical Microbiology*, 40 (2): 584-587.

**Numazaki K, Niida Y.** 2000. Two cases of intrauterine *Chlamydia trachomatis* infection. *Antimicrobics and Infectious Diseases Newsletter*, 18: 6-8.

**Numazaki K, Asanuma H, Niida Y.** 2003. *Chlamydia trachomatis* infection in early neonatal period. *BMC Infectious Diseases*, 3 (2): 1471-2334

**Odeh M, Oliven A.** 1992. Chlamydial infections of the heart. *European Journal of Microbiology and Infectious Diseases*, 11: 885-893.

- Oehme A.** 1999. Verfahren zum Nachweis von Antikörpern gegen Chlamydien: Bewertung. Hygiene und Mikrobiologie, 1: 50-54.
- Parthier B, Hrsg.** 1995. Jahrbuch der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina. Dritte Reihe. Halle/Saale: Eigenverlag der Leopoldina, 133-136.
- Paz M, De Otero J, Codinach P, Ferrer-Ruscalleda F, Gaya M, Ibernón M.** 1998. Infection and coronary atherosclerosis: the role *Chlamydia pneumoniae*. Revista Espanola Cardiologia, 51 (11): 857-863.
- Peeling RW, Brunham RC.** 1996. Chlamydiae as pathogens: new species and new issues. Emerging Infectious Diseases, 2 (4): 307-319.
- Peeling RW, Wang SP, Grayston JT, Blasi F, Boman J, Clad A, Freidank H, Gaydos CA, Gnärpe J, Hagiwara T, Jones RB, Orfila J, Persson K, Puolakkainen M, Saikku P, Schachter J.** 2000. *Chlamydia pneumoniae* serology: interlaboratory variation in Microimmunofluorescence assay results. The Journal of Infectious Diseases, 181, Suppl. 3: 426-429.
- Persson K, Boman J.** 2000. Comparison of five serological tests for diagnosis of acute infections by *Chlamydia pneumoniae*. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 7 (5): 739-744.
- Pressekonferenz Galaxo-Wellcome.** 1998. Fluorchinone zur oralen Therapie von Atemwegsinfektionen. Pneumologie, 52 (12): 743.
- Reber H.** 1991. Mikrobiologische Diagnostik. Asthma Bronchitis Emphysem, 9 (1): 41-44.
- Reed KD, Ruth GR, Meyer JA, Shukla SK.** 2000. *Chlamydia pneumoniae* infection in a breeding colony of African clawed frogs (*Xenopus tropicalis*). Emerging Infectious Diseases, 6 (2): 196-199.

**Reinhold P, Sachse K.** 2004. Chlamydieninfektionen beim Tier. *Pneumologie*, 58: 271-288.

**Ridgway GL, Taylor-Robinson D.** 1991. Current problems in microbiology: Chlamydial infections. Which laboratory test? *Journal of clinical Pathology*, 44 (1): 1-5.

**Rockey DD, Lenart J, Stephens RS.** 2000. Genome sequencing and our understanding of Chlamydiae Minireview. *Infection and Immunity*, 68 (10): 5473-5479.

**Russell EG.** 1999. Evaluation of two serological tests for the diagnosis of chlamydial respiratory disease. *Pathology*, 31 (4): 403-405.

**Sachse K, Grossmann E.** 2002. Chlamydial diseases of domestic animals - zoonotic potential of the agents and diagnostic issues. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 109 (4): 142-148.

**Saikku P, Leinonen M, Mattila K, Ekman MR, Nieminen MS, Makela PH, Huttunen JK, Valtonen V.** 1988. Serological evidence of an association of a novel Chlamydia, TWAR, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction. *Lancet*, 2: 983-986.

**Saikku P.** 1992. The epidemiology and significance of *Chlamydia pneumoniae*. *Journal of Infection*, 25, Suppl. 1. 27-34.

**Saikku P.** 1998. Diagnosis of *Chlamydia pneumoniae*. *Clinical Microbiology and Infection*, 4, Suppl. 4: 7-13.

**Saikku P.** 2000. Epidemiologic association of *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis: The initial serologic observation and more. *The Journal of Infectious Diseases*, 181, Suppl. 3: 411-413.

**Schaberg T, Dalhoff K, Ewig S, Lorenz J, Wilkens H.** 1998. Deutsche Gesellschaft für Pneumologie: Empfehlungen zur Therapie der ambulant erworbenen Pneumonie. *Pneumologie*, 52 (8): 450-462.

- Schachter J, Stamm WE.** 1999. Chlamydia. In: Murray PR, Baron EF, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, Hrsg. Manual of clinical microbiology. Siebente Aufl. Washington DC: Press, 669-677.
- Sriram S, Mitchell W, Stratton C.** 1998. Multiple sclerosis associated with *Chlamydia pneumoniae* infection of the CNS. Neurology, 50: 571-572.
- Stahlmann R.** 1999. Fluorchinone zur Therapie von Atemwegsinfektionen. Pneumologie, 53 (11): 521-529.
- Stephens RS, Kalman S, Lammel C, Fan J, Morathe R, Aravind L, Mitchell W, Olinger L, Tatusov RL, Thao Q, Koonin EV, Davis RV.** 1998. Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis*. Science, 282: 754-759.
- Stephens RS, Hrsg.** 1999. Chlamydia: intracellular biology, pathogenesis, and immunity. Washington DC: American Society for Microbiology.
- Stephenson J.** 1999. New studies illuminate brain disorders. Journal of the American Medical Association, 281: 499-501.
- Thom DH, Grayston JT, Campbell LA, Kuo CC, Diwan VK, Wang SP.** 1994. Respiratory infection with *Chlamydia pneumoniae* in middle-aged and older adult outpatients. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 13 (10): 785-792.
- Tipples G, McClarty G.** 1993. The obligate intracellular bacterium *Chlamydia trachomatis* is auxotrophic for three of the four ribonucleoside triphosphates. Molecular Microbiology, 8 (6): 1105-1114.
- Tuschy P, Lorenz J.** 2004. Atypische Erreger der ambulant erworbenen Pneumonie. Deutsche Medizinische Wochenschrift, 129: 503-508.



**Tuuminen T, Palomäki P, Paavonen J.** 2000. The use of serologic tests for the diagnosis of chlamydial infections. *Journal of Microbiological Methods*, 42 (3): 265-279.

**Vandahl BB, Birkelund S, Demol H, Hoorelbeke B, Christiansen G, Vandekerckhove J, Gevaert K.** 2001. Proteome analysis of the *Chlamydia pneumoniae* elementary body. *Electrophoresis*, 22: 1204-1223.

**van der Lely N, Stals FS, Forget PP.** 1993. A child with *Chlamydia trachomatis* pneumonia. *Tijdschr Kindergeneeskde*, 61 (5): 194-197.

**Verkooyen RP, Hazenberg MA, van Haaren GH, van den Bosch JM, Snijder RJ, van Helden HP, Verbrugh HA.** 1992. Age related interferences with *Chlamydia pneumoniae* microimmunofluorescence serology due to circulating rheumatoid factor. *Journal of Clinical Microbiology*, 30: 1289-1290.

**Verkooyen RP, van Lent NA, Mousavi Joulandan SA, Snijder RJ, van Den Bosch JM, van Helden HP, Verbrugh HA.** 1997. Diagnosis of *Chlamydia pneumoniae* infection in patients with chronic obstructive pulmonary disease by micro-immunofluorescence and ELISA. *Journal of Medical Microbiology*, 46 (11): 959-964.

**Verkooyen RP, Willemse D, Hiep-van Casteren SCAM, Mousavi Joulandan SA, Snijder RJ, van den Bosch JM, van Helden HP, Peeters MF, Verbrugh HA.** 1998. Evaluation of PCR, culture and serology for diagnosis of *Chlamydia pneumoniae* respiratory infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 36 (8): 2301-2307.

**Virion/Serion.** 2001. Serion ELISA classic, Chlamydia IgA, IgG/quant., Arbeitsanleitung.

**Vollandt R.** 1999. Medizinische Statistik für Humanmediziner, Vorlesungsskript Wintersemester 1999/2000. Jena: Institut für Medizinische Statistik, Informatik und Dokumentation der Friedrich-Schiller-Universität, 47-49.

**Wang SP, Grayston JT.** 1970. Immunological relationship between genital TRIC, Lymphogranuloma venereum, and related organisms in a new microtiter indirect immunofluorescence test. *American Journal of Ophthalmology*, 70 (3): 367-374.

**Wang SP, Grayston JT.** 1990. Population prevalence antibody to *Chlamydia pneumoniae*, strain TWAR. In: Proceedings of the 7<sup>th</sup> International Symposium on Human Chlamydial Infections. Harrison Hot Springs, Canada, 402-405.

**Wang SP, Grayston JT.** 1993. The similarity of *Chlamydia pneumoniae* (TWAR) isolates as antigen in the microimmunofluorescence (MIF) test. In: Orfila J, Hrsg. Chlamydial infections. Bologna, Italy: Societa Editrice Esculapio, 181-416.

**Wang SP, Grayston JT.** 1998. *Chlamydia pneumoniae* (TWAR) Microimmunofluorescence antibody studies - 1998 Update. In: Stephens RS, Hrsg. Chlamydial infections, International Chlamydia Symposium. San Francisco, Calif: 155-158.

**Wang SP.** 2000. The microimmunofluorescence test for *Chlamydia pneumoniae* infection: technique and interpretation. The Journal of Infectious Diseases, 181, Suppl. 3: 421-425.

**Wardrop S, Fowler A, O'Callaghan P, Giffard P, Timms P.** 1999. Characterisation of the koala biovar of *Chlamydia pneumoniae* at four gene loci. Systematic and applied Microbiology, 22 (1): 22-27.

**Welte T, Marre R, Suttorp N.** 2003. CAPNetz - Kompetenznetzwerk ambulant erworbene Pneumonie: Strukturen und Ziele. Pneumologie, 57: 34-41.

**Weber A.** 2004. Zur aktuellen Epidemiologie ausgewählter bakterieller Zoonosen. Gesundheitswesen, 66, Sonderheft 1: 26-30.

**Wills JM, Watson G, Lusher M, Mair TS, Wood D, Richmond SJ.** 1990. Characterisation of *Chlamydia psittaci* isolated from a horse. Veterinary Microbiology, 24 (1): 11-19.

**Woessner R, Treib J.** 2001. Chlamydieninfektionen in der Neurologie. Deutsche Medizinische Wochenschrift, 126: 153-155.

**Woodhead M, Torres A.** 1997. Definition and classification of community-acquired and nosocomial pneumonias. European Respiratory Monograph, 3: 1-12.

**Yucesan C, Sriram S.** 2001. *Chlamydia pneumoniae* infection of the central nervous system. Current Opinion Neurology, 14: 355-359.

## 10. ANHANG

### 10.1 VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN

Abb. 1: Seren von Patienten mit Pneumonie, Gesamt-IgG, Vergleich von MIF-Test und Virion/Serion-Test .....	36
Abb. 2 : Seren von Patienten mit Pneumonie, IgG, Vergleich von MIF-Test (schraffierte Balken) und Virion/Serion-Test (nicht schraffierte Balken) bei verschiedenen Titern .....	38
Abb. 3: Seren von Patienten mit Pneumonie, Gesamt-IgA, Vergleich von MIF-Test und Virion/Serion-Test .....	39
Abb. 4: Seren von Patienten mit Pneumonie, IgA, Vergleich von MIF-Test (schraffierte Balken) und Virion/Serion-Test (nicht schraffierte Balken) bei verschiedenen Titern .....	41
Abb. 5: Seren von Patienten mit urogenitalen Infektionen, Gesamt-IgG, Vergleich von MIF-Test und Virion/Serion-Test .....	42
Abb. 6: Seren von Patienten mit urogenitalen Infektionen, IgG, Vergleich von MIF-Test (schraffierte Balken) und Virion/Serion-Test (nicht schraffierte Balken) bei verschiedenen Titern .....	45
Abb. 7: Seren von Patienten mit urogenitalen Infektionen, Gesamt-IgA, Vergleich von MIF-Test und Virion/Serion-Test .....	46
Abb. 8: Seren von Patienten mit urogenitalen Infektionen, IgA, Vergleich von MIF-Test (schraffierte Balken) und Virion/Serion-Test (nicht schraffierte Balken) bei verschiedenen Titern .....	48
Abb. 9: Seren der Blutspender, Gesamt-IgG, Vergleich von MIF-Test und Virion/Serion-Test .....	51
Abb. 10: Seren von Blutspendern, IgG, Vergleich von MIF-Test (schraffierte Balken) und Virion/Serion-Test (nicht schraffierte Balken) bei verschiedenen Titern .....	53
Abb. 11: Seren der Blutspender, Gesamt -IgA, Vergleich von MIF-Test und Virion/Serion-Test .....	55
Abb. 12: Seren von Blutspendern, IgA, Vergleich von MIF-Test (schraffierte Balken) und Virion/Serion-Test (nicht schraffierte Balken) bei verschiedenen Titern .....	56
Abb. 13: Vergleich der IgM-Gesamtergebnisse von MIF-Test und Medac-Test .....	62
Abb. 14: Vergleich von MIF-Test (schraffierte Balken) und Medac-Test (nicht schraffierte Balken) für IgM bei verschiedenen Titern .....	63
Abb. 15: Vergleich der IgM-Gesamtergebnisse von MIF-Test und SeroCP-Test .....	64

Abb. 16: Vergleich von MIF-Test (schraffierte Balken) und SeroCP-Test (nicht schraffierte Balken) für IgM bei verschiedenen Titern.....	66
Abb. 17: Vergleich der IgM-Gesamtergebnisse von MIF-Test und IgM-Testkonjugat.....	67
Abb. 18: Vergleich von MIF-Test (schraffierte Balken) und IgM-Konjugat (nicht schraffierte Balken) bei verschiedenen Titern.....	69

## 10. 2 VERZEICHNIS DER TABELLEN

Tab. 1: Seren von Patienten mit Pneumonie, Gesamt-IgG, Vergleich von MIF-Test und Virion/Serion-Test .....	36
Tab. 2: Seren von Patienten mit Pneumonie, IgG, Vergleich von MIF-Test und Virion/Serion-Test bei verschiedenen Titern.....	38
Tab. 3: Seren von Patienten mit Pneumonie, Gesamt-IgA, Vergleich von MIF-Test und Virion/Serion-Test .....	39
Tab. 4: Seren von Patienten mit Pneumonie, IgA, Vergleich von MIF-Test und Virion/Serion-Test bei verschiedenen Titern.....	41
Tab. 5: Seren von Patienten mit urogenitalen Infektionen, Gesamt-IgG, Vergleich von MIF-Test und Virion/Serion-Test .....	42
Tab. 6: Seren von Patienten mit urogenitalen Infektionen, IgG, Vergleich von MIF-Test und Virion/Serion-Test bei verschiedenen Titern.....	44
Tab. 7: Seren von Patienten mit urogenitalen Infektionen, Gesamt-IgA, Vergleich von MIF-Test und Virion/Serion-Test.....	46
Tab. 8: Seren von Patienten mit urogenitalen Infektionen, IgA, Vergleich von MIF-Test und Virion/Serion-Test bei verschiedenen Titern.....	47
Tab. 9: Seren der Blutspender, Gesamt-IgG, Vergleich von MIF-Test und Virion/Serion-Test.....	51
Tab. 10: Seren von Blutspendern, IgG, Vergleich von MIF-Test und Virion/Serion-Test bei verschiedenen Titern.....	53
Tab. 11: Seren der Blutspender, Gesamt-IgA, Vergleich von MIF-Test und Virion/Serion-Test.....	54
Tab. 12: Seren von Blutspendern, IgA, Vergleich von MIF-Test und Virion/Serion-Test bei verschiedenen Titern.....	56
Tab. 13: Vergleich der IgM-Gesamtergebnisse von MIF-Test und Medac-Test .....	61
Tab. 14: Vergleich von MIF-Test und Medac-Test für IgM bei verschiedenen Titern.....	63
Tab. 15: Vergleich der IgM-Gesamtergebnisse von MIF-Test und SeroCP-Test.....	64
Tab. 16: Vergleich von MIF-Test und SeroCP-Test für IgM bei verschiedenen Titern .....	65
Tab. 17: Vergleich der IgM-Gesamtergebnisse von MIF-Test und IgM-Testkonjugat .....	67
Tab. 18: Vergleich von MIF-Test und IgM-Konjugat bei verschiedenen Titern .....	68